



INVESTIGAÇÃO DE TÉCNICAS DE CONTROLO DE FRAUDES NO ÂMBITO DO COMÉRCIO DE PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS

Clarinda Maria Santos Paixão Pereira

INVESTIGAÇÃO DE TÉCNICAS DE CONTROLO DE FRAUDES NO ÂMBITO DO COMÉRCIO DE PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS

Trabalho realizado com vista

à obtenção do grau de Mestre

Nome: Clarinda Maria Santos Paixão Pereira

N.º: 090326015

Supervisor: Professora Doutora Margarida Goulart

Orientador: Professora Doutora Lígia Salgueiro –

- Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Agradecimentos

São várias as pessoas a quem devo o apoio e o contributo para a realização deste trabalho.

À professora Doutora Lúcia M. Ribeiro Salgueiro, orientadora deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos. Pela sua disponibilidade, pela sua análise crítica e pelas suas sugestões durante o meu estágio e durante todo este percurso, muito obrigada.

À Doutora Margarida Goulart, co-orientadora deste trabalho, por me ter guiado, revelou-se uma ajuda fundamental para eu conseguir concluir a dissertação. Obrigada pela sua disponibilidade, colaboração e apoio.

Ao Doutor Artur Amaral por ter sido a ligação que eu precisava encontrar para poder terminar dentro do prazo.

Ao Doutor A. Proença da Cunha, o mestre que muito admiro, reconheço o seu incentivo para eu fazer o estágio na Faculdade de Farmácia Universidade de Coimbra. Muito obrigada pelo voto de confiança.

À professora Doutora Natália Gaspar, que desde o início me incentivou e orientou. Pela sua amizade e disponibilidade, a minha sincera gratidão. Obrigada por ter acreditado em mim.

À Doutora Teresa Amaral, os meus sinceros agradecimentos pela sua disponibilidade, simpatia e dedicação com que me acolheu.

À minha família, pela ajuda constante, mesmo nos momentos em que estive ausente. Ao José Manuel pelo seu amor, a sua paciência e a sua perseverança. Aos meus filhos, Daniel e Joel, obrigada pelo estímulo, pela força, pelo entusiasmo e dedicação, em particular ao Joel que foi incansável, muito paciente e um grande amigo. À minha irmã Dina, obrigada por estar comigo, pelo seu apoio e pela sua cooperação. Aos meus pais que apesar de não compreenderem a minha persistência em continuar, aceitaram a minha determinação.

Um agradecimento especial para a Inês, que foi comigo a Coimbra no primeiro dia de estágio, mostrou-me o caminho, deu-me conselhos e foi sempre percorrendo todo o percurso ao meu lado com amizade até eu conseguir alcançar a meta final. A sua ajuda foi preciosa para ultrapassar todos os obstáculos e conseguir superar as dificuldades. Um agradecimento à Sandra, à Paula e à Dora, pelo entusiasmo e coragem que me deram nos momentos mais difíceis.

A todos aqueles que não mencionei mas com os quais convivi e que jamais irei esquecer. Pela vossa amizade e carinho, muito obrigada.

Investigação de Técnicas de controlo de fraudes no âmbito do comércio de Plantas Medicinais e Aromáticas

Resumo

Atendendo ao crescente interesse por produtos naturais e consequente incremento do comércio de plantas aromáticas e medicinais, revelou-se imperativa a investigação de técnicas de controlo de fraudes neste âmbito. Apesar da importância das plantas medicinais espontâneas, valoriza-se o seu cultivo em modo de produção biológico, respeitando as boas práticas agrícolas de acordo com os requisitos da Organização Mundial de Saúde e valorizando a qualidade, a segurança e a eficácia destes produtos.

Estudando diversas plantas, recorreu-se à extracção de óleos essenciais e à cromatografia em camada fina (TLC) para investigar os seus principais constituintes. Executaram-se ainda processos rápidos de detecção de falsificações, através do teste da mancha do papel, da contracção do volume de essência, do ensaio da fucsina, e da análise das plantas em estado pulverizado.

Este trabalho é útil e aplicável em qualquer unidade de produção de plantas aromáticas e medicinais para fins industriais, pois recorre a metodologias simples e de baixo custo. A implementação de diversos procedimentos de gestão de qualidade é uma garantia de um sistema de autocontrolo – HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points), segundo o *Codex Alimentarius*, criando processos dinâmicos que incitem a constante melhoria e desenvolvimento tecnológico, evitando contaminações por agentes físicos, químicos e biológicos, falsificações e fraudes.

Palavras-chave: Plantas Medicinais, Fraudes, Falsificações, Contaminação, Controlo de Qualidade, Segurança, Óleos Essenciais.

Investigation of Fraud Control Techniques in the Ambit of Aromatic and Medicinal Plants Trade

Abstract

Considering the growing interest on natural products and, consequently, the increase of medicinal and aromatic plants trade, the investigation of fraud control techniques became imperative.

Despite the importance of spontaneous medicinal plants, biological production cultures are well-valued, respecting good agricultural practices, according to the World Health Organization requisites, which establish the quality, security and efficacy of these products.

With the purpose of studying several plants, essential oils extraction and Thin-Layer Chromatography (TLC) were used to investigate the principal constituents of each species. Rapid detection of falsifications procedures were also used, like the paper stain test, the volume of essence contraction essay, the fuchsine essay, and the analysis of plants on their pulverized state.

This investigation is useful and applicable in any aromatic and medicinal plants production unit for industrial purposes, because it resorts to simple and low cost methodologies. According to the *Codex Alimentarius*, the implementation of quality management procedures is a guaranty of a self-control system - HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points), creating dynamic processes which will provide a constant improvement and technological development, avoiding contaminations by physical, chemical and biological agents, falsifications and frauds.

Keywords: Medicinal Plants, Frauds, Falsifications, Contamination, Quality Control, Security, Essential Oils.

Índice

Capítulo I – Introdução	1
1. Objectivos	1
2. Introdução.....	1
Capítulo II – Importância das Plantas Medicinais	4
1. História	4
2. Importância das plantas medicinais na actualidade.....	8
3. Cultivo de Plantas Medicinais	11
4. Boas práticas agrícolas de colheita e conservação de plantas	13
Capítulo III - Medicamentos à base de Plantas	18
1. Regulamentação e segurança	18
2. Regras na preparação de medicamentos à base de plantas	21
3. Directrizes sobre medicamentos de uso tradicional	23
Capítulo IV – Plantas Aromáticas.....	26
1. Definição	26
2. Óleos Essenciais.....	27
2.1. Actividade Biológica de Óleos Essenciais	29
Capítulo V – Controlo de Qualidade	31
1. Alguns testes e técnicas.....	31
2. Técnicas de Controlo de Qualidade	32
2.1. Testes de Identificação	33
2.2. Ensaios de Controlo de Qualidade	34
2.2.1. Testes de Pureza	35
2.2.2. Métodos de Referência	35
3. O uso da genética na identificação de espécies e substâncias vegetais	36
Capítulo VI – Investigação Laboratorial	39
1. Material vegetal estudado e sua importância	39
a) <i>Crataegus monogyna</i> L. (Pirriteiro ou Espinheiro alvar)	39
b) <i>Thymus zygis</i> L. (Tomilho ou Sal-da-terra).....	41
c) <i>Lavandula luisieri</i> L. (Rosmaninho).....	42
d) <i>Hypericum perforatum</i> L. (Hiperidão Kneip ou Erva de São João).....	43
e) <i>Hypericum androsaemum</i> L. (Hiperidão-do-Gerês).....	45
2. Investigação Laboratorial.....	46
2.1. Principais Constituintes de <i>Crataegus monogyna</i> L.....	46
2.1.1. Material e Métodos	46

2.1.2.	Procedimento Experimental.....	48
2.1.2.1.	Colheita e Processamento de <i>Crataegus monogyna</i> L.	48
2.1.2.2.	Extracção de <i>Crataegi fructus</i> e de <i>Crataegi folium</i>	48
2.1.2.3.	Cromatografia em Camada Fina (TLC) de extractos de <i>Crataegi fructus</i> e de <i>Crataegi folium</i>	49
2.1.3.	Resultados.....	50
2.1.3.1.	Resultados Esperados	50
2.1.3.2.	Resultados Obtidos	50
2.1.3.3.	Discussão dos Resultados	51
2.2.	Extracção de óleos essenciais por hidrodestilação	52
2.2.1.	Material e Métodos	52
2.2.2.	Procedimento Experimental.....	53
2.2.2.1.	Colheita e Processamento de <i>Thymus zygis</i> L. e de <i>Lavandula luisieri</i> L.	53
2.2.2.2.	Extracção de óleos essenciais das folhas e flores secas de <i>Thymus zygis</i> L. e de <i>Lavandula luisieri</i> L. por hidrodestilação em aparelho <i>Clevenger</i>	53
2.2.2.3.	Resultados Obtidos	54
2.2.2.4.	Discussão dos Resultados	54
2.2.3.	Principais Constituintes de <i>Thymus zygis</i> L.....	54
2.2.3.1.	Material e Métodos.....	54
2.2.3.2.	Cromatografia em camada fina (TLC) de óleo essencial de Tomilho	55
2.2.3.3.	Resultados Esperados	56
2.2.3.4.	Resultados Obtidos	56
2.3.	Identificação de duas espécies de Hiperício	57
2.3.1.	Material e Métodos	57
2.3.2.	Procedimento Experimental.....	58
2.3.3.	Resultados.....	58
2.3.3.1.	Identificação.....	58
2.3.3.2.	Discussão dos Resultados	58
2.4.	Processos rápidos de detecção de falsificações	59
2.4.1.	Material e Métodos	59
2.4.1.1.	Material	59
2.4.1.2.	Procedimento Experimental	59
2.4.1.2.1.	Pesquisa de óleos, gorduras e resinas através de ensaio da mancha no papel..	59
2.4.1.2.2.	Pesquisa de falsificações pelo álcool, por contracção do volume de essência ...	60
2.4.1.2.3.	Ensaio de fucsina	60
2.4.2.	Resultados.....	60

Capítulo VII – Conclusão62

Referências bibliográficas65

Capítulo I – Introdução

1. Objectivos

Inserido no âmbito da realização da Dissertação de Mestrado em Produção de Plantas Medicinais para Fins Industriais, este trabalho tem como objectivo principal a pesquisa de algumas técnicas de controlo de fraudes no ramo do comércio de plantas medicinais e aromáticas recorrendo, para tal, a metodologias simples, que possam estar ao alcance de pequenas empresas, mas que permitam efectuar análises fiáveis e mais expeditas.

2. Introdução

Este trabalho prende-se com o uso seguro de produtos à base de plantas medicinais, sejam eles medicamentos tradicionais ou suplementos alimentares. Neste âmbito, assegurar uma premissa de prevenção dos riscos para a saúde do consumidor está intimamente relacionado com o cumprimento de requisitos de qualidade, segurança e eficácia.

Actualmente, verifica-se que a indústria farmacêutica tem vindo a desenvolver e aplicar métodos de avaliação de qualidade e segurança dos medicamentos à base de plantas, recorrendo a metodologias de grande rigor. No entanto, outros produtos, como por exemplo, suplementos alimentares e plantas vendidas a granel não têm sido alvo de um controlo tão apertado. Neste sentido, tem emergido como fundamental o desenvolvimento de técnicas que avaliem e exijam o cumprimento de critérios apertados para produtos à base de plantas medicinais e aromáticas.

De acordo com o contexto global de garantia da qualidade e controlo de produtos fitoterápicos, a Organização Mundial de Saúde (OMS, em inglês, WHO, World Health Organization) desenvolveu orientações sobre boas práticas agrícolas e de colheita (GACP) para plantas medicinais, com orientação técnica geral sobre a obtenção de materiais de boa

qualidade para a produção sustentável de produtos naturais classificados como medicamentos (WHO, 2003). Essas orientações estão relacionadas com o trabalho desta agência sobre a protecção de plantas medicinais, visando a promoção da utilização sustentável e cultivo de plantas medicinais.

Após uma breve resenha histórica sobre a utilidade e interesse que as plantas medicinais e aromáticas têm vindo a deter ao longo de toda a história da humanidade, serão focadas as diversas fases de processamento destas plantas, dando-se relevo a aspectos do seu crescimento espontâneo ou cultivo, colheita, secagem e conservação. A importância de adopção de boas práticas agrícolas, por parte de agricultores e outros interessados (como produtores e processadores) será focada. Estas evitam a contaminação por agentes microbianos ou químicos durante qualquer das etapas mencionadas e revelam-se fundamentais para garantir a segurança e qualidade dos produtos. Com o mesmo intuito e importância devem, também, ser aplicadas medidas na colheita de plantas medicinais espontâneas. O reconhecimento das plantas ou partes destas reveste-se de importância fulcral como forma de evitar erros de identificação, contaminações acidentais ou adulterações intencionais (WHO, 2003).

Também os medicamentos à base de plantas serão alvo de uma breve enumeração neste trabalho, destacando-se aspectos da sua regulamentação em vários países, bem como algumas regras para a sua preparação.

Com um papel central neste projecto, as plantas aromáticas serão abordadas, dando-se particular importância aos óleos essenciais e às suas actividades biológicas.

Assim, no âmbito do funcionamento de uma empresa de processamento e comercialização de plantas medicinais, o controlo da matéria-prima constitui uma importante e determinante fase. Actualmente, com uma procura cada vez maior de produtos à base de plantas medicinais, cabe a estas empresas controlar alguns parâmetros de qualidade,

apresentando ao consumidor informação clara e credível que possibilite uma utilização consciente. É este processo de controlo de qualidade de um produto, que apresenta uma forte dinâmica devido às várias etapas que abrange desde a obtenção de matéria-prima, passando por todo o processo de produção, culminando com a análise do produto final. Os parâmetros de controlo de qualidade, variam de espécie para espécie e podem ser encontradas nas monografias constantes em farmacopeias (e.g. Farmacopeia Portuguesa, Farmacopeia Europeia). Neste sentido, algumas técnicas de controlo de qualidade da matéria-prima vegetal serão abordadas de forma detalhada. A identificação de matérias de plantas medicinais através do ADN será referida numa última fase, terminando esta dissertação com a descrição e análise do trabalho desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, onde decorreu o meu estágio. Durante a sua realização foram levados a cabo diferentes trabalhos práticos de investigação (de fácil aplicação e execução rápida) que permitem revelar algumas dessas fraudes.

Capítulo II – Importância das Plantas Medicinais

1. História

De acordo com Bown (1995), durante toda a história da humanidade as plantas medicinais têm exercido um papel determinante nas tradições médicas, sendo o seu conhecimento transmitido de geração em geração. Segundo este autor, as primeiras plantas medicinais e aromáticas foram plantadas nos jardins dos templos, no Egito, há cerca de 4000 anos. Os conhecimentos desta civilização egípcia foram transmitidos aos Gregos e posteriormente aos Romanos, que aplicavam perfumes e óleos aromatizados em massagens.

Já os textos hieroglíficos descreviam a aplicação médica das plantas. O “Papiro de Ebers” descoberto nos finais do Século XIX, em Luxor, descreve em detalhe a elaboração e aplicação de matérias-primas minerais e vegetais. Inclui uma compilação de 800 receitas para preparar decocções, pílulas e loções, assim como diversas misturas para serem usadas em gargarejos (Grünwald & Jänicke, 2009).

Hipócrates (aprox. 460-375 a.C), nas suas viagens pela Grécia e Ásia Menor, ampliou os seus conhecimentos curativos, e quando regressou à sua ilha de origem, Kos, passou a ensinar medicina na sua própria escola, mencionando as primeiras teorias científicas e fazendo observações médicas sistemáticas. Segundo Grünwald & Jänicke (2009), aconselhava o uso de remédios vegetais, de dietas e outras alterações do modo de vida. Vólak & Stodola (1983) destacam que foi nesta época que surgiu a teoria de que existia uma ligação entre a forma das plantas e a doença que é suposto curar. A obra de Hipócrates (*natura signa*) mostra-nos o poder medicinal das plantas.

A História das Plantas (*Historia Plantarum*) de Teofrasto de Ereso (Aprox. 372-322 a.C.), foi a primeira obra completa sobre plantas, com indicações sobre efeitos tóxicos e atributos curativos de cada planta, essenciais para a terapêutica (Cunha, Ribeiro & Roque, 2009).

Por sua vez, a medicina romana inspirou-se principalmente nos gregos. Plínio-o-Velho (23-79 d.C.) compilou vários trabalhos dedicados ao estudo da natureza na enciclopédia *Historia Naturalis*, que contém inúmeras instruções sobre a aplicação médica das plantas. Na mesma época surgiu outra obra, *Matéria Médica* de Pedanius Dioscórides (40-90 d.C.), um grego que serviu como médico militar às ordens do Imperador Nero. Foi uma obra de referência médica até à Idade Moderna, apresentando ilustrações, descrições e conselhos sobre a utilização de cerca de 600 plantas, e outros produtos de origem animal e mineral (Cunha, Ribeiro & Roque, 2009).

Seguiu-se, entre outros, Cláudio Galeno (aprox. 130-200 d.C.), o médico mais importante da Antiguidade a seguir a Hipócrates. De acordo com Webb & Craze (2000), Galeno foi o primeiro a tentar formar um sistema de medicina que demarcasse definitivamente, médicos de curandeiros tradicionais. Este médico elaborava receitas muito complexas que incluíam dezenas de ingredientes. Utilizava diversos métodos para misturar, extrair e refinar drogas, os quais deram lugar a medicamentos de qualidade reproduzível, que prevaleceram na medicina ocidental durante mais de 1500 anos. Muitas das tradições transmitidas desde a Antiguidade Grega conservaram-se nos mosteiros europeus e nas culturas orientais. Os Árabes também assimilaram grande parte da sabedoria greco-romana e desenvolveram-na com os seus próprios preparados de plantas de origem persa, indiana e chinesa. Utilizavam diversas plantas como cânfora, sene, noz-moscada, ruibarbo, sândalo, tamarindo e cravinho (Cunha, Ribeiro & Roque, 2009).

A partir do século VII, começou a estudar-se medicina de forma regular nos mosteiros de Inglaterra, Irlanda, França, Alemanha e Suíça. As plantas medicinais colhidas nos campos e florestas próximos eram as matérias-primas das farmácias, passando mais tarde a ser cultivadas nos jardins dos mosteiros, onde cresciam imensas plantas autóctones além de plantas exóticas trazidas pelos peregrinos e monges (Vólak & Stodola, 1983). O decreto

que regulava os bens da corte de Carlo Magno (768-814), denominado *Capitulare de Villis et Curtis Imperialibus*, teve uma grande importância para a criação dos jardins medicinais. Por ordem do Imperador, um abade beneditino da Normandia elaborou uma lista com 73 plantas e 16 árvores que tinham de ser cultivadas e plantadas em todas as terras (Grünwald & Jänicke, 2009).

Hildegard von Bingen foi a médica mais famosa da Idade Média. Escreveu dois importantes livros: *Physica* e *Causae et Curae*, tendo utilizado pela primeira vez tanto o nome latino como a denominação popular de plantas e árvores (Vólak & Stodola, 1983).

Em meados do século XII, apareceu uma obra muito importante para a Fitoterapia: *Circa Instans*, contendo 270 monografias onde são descritas não só as plantas, mas também os medicamentos que derivam delas, além de fornecer indicações sobre as características de qualidade e possíveis falsificações. Esta obra, que continha uma relação das principais qualidades e dos efeitos das plantas, assim como instruções sobre as suas aplicações, difundiu-se rapidamente na Europa (Grünwald & Jänicke, 2009). Os mesmos autores referem que a partir dos séculos XIV e XV, apareceram diversos livros especializados em plantas e medicamentos, entre os quais se destaca *Gart der Gesuntheit*, a primeira edição ilustrada em alemão com gravuras de um herbário.

Uma outra obra com destaque, publicada em 1597, *The Herball or Generall Historie of Plantes*, escrito pelo ervanário e cirurgião inglês John Gerard, apresentava a origem, a história, o uso e o método de plantação de cada planta adequado a cada espécie (Webb & Craze, 2000).

O renascimento da fitoterapia deu-se no século XVI, quando as plantas começaram a ser cultivadas nos jardins das universidades europeias, para o ensino de botânica e medicina (Bown, 1995). Esta época caracterizou-se pela publicação de vários herbários, onde as plantas começaram a ser ordenadas de acordo com a sua família botânica. No entanto, só

no século XVIII, o botânico sueco Carl von Linné formulou a sistematização actualmente vigente do reino vegetal, de acordo com certas características específicas dos seus órgãos reprodutores, tendo fundado a nomenclatura botânica moderna. O nome científico de uma espécie consta da denominação do género, do epíteto e do nome abreviado ou completo da pessoa que a descreveu pela primeira vez (e.g., Linné abrevia-se com L.). Na sua obra *Systema naturae* agrupou quase todas as plantas do mundo em cerca de 300 famílias (Grünwald & Jänicke, 2009). O próprio *Herbarium* de Linné foi uma ajuda essencial para as instituições botânicas, nomeadamente na investigação teórica da classificação de milhares de espécies. (Thomson, 1980).

Cunha *et al.* (2007) refere que as ideias de Paracelso foram aplicadas apenas a partir do século XVIII, quando se deu uma importante evolução da Química, procurando de um modo sistemático isolar e determinar a estrutura dos constituintes activos dos produtos de origem natural dotados de propriedades medicinais. Foram os trabalhos do sueco Scheele, na sua farmácia, que deram início a esta nova etapa, obtendo, a partir de produtos naturais, vários ácidos orgânicos e ainda a lactose e a glicerina. Seguiram-se outros farmacêuticos e químicos, como Derosne, que extraiu do ópio a narcotina e uma mistura de alcalóides, da qual Serturmer, em 1816, isolou a morfina. Pelletier e Caventou isolaram a estricnina em 1818. Leroux obteve a salicina do salgueiro em 1830, que iria depois conduzir à síntese do ácido acetilsalicílico, que após ser isolado foi obtido sinteticamente fazendo com que a Aspirina tenha hoje em dia imensas aplicações médicas (Waizel-Bucay, 2011). Por sua vez, Robiquet extraiu a amigdalina das amêndoas amargas e Nativelle obteve a digitalina cristalizada da dedaleira.

Já em Portugal, em 1810, Bernardino António Gomes torna-se o primeiro investigador a obter um dos alcalóides da casca de quina, que denominou de “chinchonino”, tendo o seu

trabalho sido publicado no *Medical and Cirurgical Journal* e reconhecido internacionalmente (Cunha *et al.*, 2007).

2. Importância das plantas medicinais na actualidade

Nos últimos anos, a utilização de plantas medicinais tem suscitado um crescente interesse mundial, provocando um aumento da procura de algumas espécies. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003) aproximadamente 28% das espécies vegetais têm uma aplicação terapêutica, e uma grande parte destas plantas medicinais obtém-se a partir de colheitas espontâneas. Actualmente são utilizadas em todo o mundo cerca de 35 mil plantas medicinais, sendo dois terços delas provenientes de colheitas silvestres. Nascidas de forma espontânea e existindo em grande quantidade na Natureza, tais plantas têm suscitado, desde sempre, o interesse das populações pela sua colheita, as quais muitas vezes transformam essa tarefa numa fonte de rendimento.

Para contrabalançar esta tendência, em 1992, foi celebrada a Convenção sobre Diversidade Biológica, no Rio de Janeiro. O principal objectivo desta convenção foi desenvolver e reforçar a consciencialização sobre o valor da diversidade biológica ou seja, a diversidade de espécies, de ecossistemas e genética. Infelizmente, a biodiversidade vê-se ameaçada pela alteração climática global e pelo desaparecimento de grandes superfícies de selva tropical. Como tal, e apesar de, durante vários anos, se dar preferência às plantas medicinais espontâneas por serem as que estavam mais à disposição do homem, a colheita abusiva de certas espécies pôs em risco a diversidade biológica e o património genético existente nas mesmas (WHO, 2003).

Segundo Schippmann (citado por Heller, 2008), activista do meio ambiente do Departamento Federal de Protecção à Natureza (BFN), a Alemanha lidera o comércio europeu de plantas medicinais, envolvendo anualmente 45 mil toneladas de diferentes

espécies, sendo o terceiro importador e exportador mundial. A magnitude desta indústria representa um problema para a protecção das espécies.

A produção industrial não será a única alternativa, uma vez que é muito difícil produzir de forma controlada a maioria destas plantas. Por exemplo, a Garra-do-Diabo (*Harpagophytum procumbens*) da Namíbia – que é colhida pela população dos bosquímanos San, dependentes desta colheita para sobreviverem – é uma matéria-prima muito procurada para a produção de medicamentos. Outro exemplo é a casca da espécie *Prunus africana* ou *Pygeum africanum*, também muito procurada, que cresce em regiões até 1000-2500 metros de altitude, nas florestas de África e Madagáscar, tendo como principais importadores desta planta países como França, Espanha, Suíça e Áustria, pondo em risco a sua existência. A forma mais eficaz de actuar para controlar a colheita silvestre é garantir a regeneração das plantas (Heller, 2008).

A CITES (Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora), fundada pela Administração Federal para a Protecção da Natureza com a finalidade de proteger orquídeas e cactos, também não conseguiu atenuar esta situação porque os países exportadores não recebem qualquer tipo de ajuda. Neste sentido, a implementação de projectos de investigação bem planeados com as populações autóctones, para um uso responsável das plantas, surge como um dos melhores caminhos a seguir. Na sua obra, Grünwald & Jänicke (2009) salientam que é possível transmitir conhecimentos sobre métodos de colheita responsáveis, apostando na formação e na educação dirigidas às populações autóctones, de forma a garantir a conservação dos recursos naturais e o controlo de uma correcta colheita.

A flora brasileira possui uma das maiores fontes de novas substâncias bioactivas, existindo uma vasta diversidade de tradições a ela associadas que são o reflexo do seu imenso potencial. Muitos destes recursos foram utilizados pelos laboratórios brasileiros, mas foram

excluídos do mercado pela inexistência de estudos de validação. Neste sentido, em 2002, a Organização Mundial de Saúde editou um documento onde reconhece que as plantas utilizadas há séculos têm valor terapêutico e devem ser aproveitadas, mas é necessário que as suas preparações passem por processos de validação (Brandão *et al.*, s.d.).

A selecção de plantas medicinais incluídas nas monografias da OMS (WHO, 2009) é baseada no uso destas plantas a nível mundial. Um dos seus objectivos é fornecer um modelo que sirva de suporte para os países desenvolverem as suas próprias monografias de plantas medicinais nacionais ou regionais.

De acordo com Brandão *et al.* (s.d.), o programa da OMS incentiva a validação de plantas medicinais e preparações utilizadas pela medicina tradicional chinesa, indiana, arábica, e as utilizadas pelos índios americanos. No entanto, muitos fitoterápicos estão a ser excluídos da medicina oficial por não existirem estudos suficientes que confirmem a sua eficácia e segurança.

De acordo com Cunha, Roque & Gaspar (2011), outro objectivo da Organização Mundial de Saúde passa por promover o uso e a terapêutica criteriosa da medicina tradicional e da medicina complementar ou paralela. Mais de um terço dos habitantes de países em desenvolvimento não tem acesso aos medicamentos primários, podendo o acesso às terapias tradicionais ou alternativas ser determinante para o desenvolvimento dos cuidados de saúde a nível mundial. Alguns países como a China, a República Democrática da Coreia, a República da Coreia do Sul e o Vietname integraram completamente a medicina tradicional nos seus sistemas de saúde.

O consumo de medicamentos à base de plantas medicinais tem aumentado principalmente nas últimas décadas, tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. Os consumidores têm preferência pelos produtos naturais à base de plantas, muitas vezes comercializados na forma de suplementos alimentares. Em Portugal, a automedicação

também é uma prática que lhes está associada. Hoje em dia, alguns consumidores já estão bem informados, e um maior conhecimento das propriedades farmacológicas das plantas resulta no seu uso racional. A fitoterapia é uma alternativa/complemento bem aceite pelos pacientes no momento de tratar as afecções ligeiras, principalmente quando apoiada pelo conselho de um técnico de saúde (Grünwald & Jänicke, 2009).

3. Cultivo de Plantas Medicinais

Cunha *et al.*, (2007) salientam que para se proceder à cultura de plantas medicinais há que ter em conta todos os aspectos económicos e agronómicos gerais, para além dos específicos de cada espécie. Assim, os parâmetros em relação ao clima, solo, irrigação, propagação vegetativa, colheita e controlo de infestantes, insectos e doenças devem ser tidos em consideração para cada planta a cultivar. Neste sentido, e tendo em conta todas as fases de desenvolvimento da planta, é importante adaptar a variedade seleccionada, tendo em conta o local de cultivo – domesticação (Cunha, Roque & Gaspar, 2011).

Muitas espécies só produzem certos compostos quando submetidas a determinadas condições de *stress*, como, por exemplo, uma reduzida disponibilidade de certos constituintes. Pelo contrário, frequentemente há a necessidade de reforçar os solos ou a irrigação com um determinado nutriente, para se poder aumentar a quantidade de um dado constituinte activo. É o caso da adição de compostos azotados ou de certos aminoácidos que aumentam a quantidade de um ou vários alcalóides (Cunha *et al.*, 2007). Para além disso, a matéria orgânica é essencial para a estrutura do solo resultante da compostagem doméstica verificando-se ser um excelente alimento para as plantas aromáticas (Denne, 2009).

Um outro aspecto relevante a ter em conta na escolha do local de cultura é a inexistência de contaminações por metais pesados (chumbo, cádmio, e mercúrio). Embora não estejam

ainda estabelecidos os teores máximos admitidos para esses metais pesados nas plantas medicinais, podem usar-se os valores indicados para os alimentos vegetais. Em Espanha, por exemplo, para as espécies vegetais usadas na alimentação, a legislação exige um limite máximo de 3ppm de arsénio e 13ppm de chumbo, enquanto para as especiarias os limites são 3ppm de arsénio e 10 ppm de chumbo (Cunha, Roque & Gaspar, 2011).

Assim, como aludido por Cunha *et al.* (2007), para as plantas se ajustarem às novas condições edáficas e climáticas, a cultura das plantas medicinais exige técnicas muito especializadas. Nalguns países europeus, o cultivo de plantas medicinais é elaborado em áreas naturais protegidas, existindo um elevado controlo de qualidade, sendo as propriedades das plantas definidas com precisão e homogeneidade. Desta forma, reduz-se a possibilidade de produção de falsificações ou confusões.

A produção em modo biológico contribui para a preservação do meio ambiente, pois exige rotação dos terrenos de cultura, adubação orgânica isenta de adubos químicos, insecticidas e herbicidas (Cunha, *et al.*, 2007). Grünwald & Jänicke (2009) salientam que a cultura biológica de plantas aromáticas e medicinais tem vindo a apresentar um crescimento de 5% por ano e promete ser um sector importante para o sector alimentar e de saúde. Não obstante, Cunha, *et al.* (2007) referem que, em termos práticos, pouco se tem feito em Portugal para que a produção nacional de plantas medicinais seja comparável à de outros países europeus, onde a cultura, transformação e comercialização estão muito mais desenvolvidos e representam uma grande indústria. O nosso país ainda está pouco desenvolvido em relação à cultura biológica de plantas aromáticas e medicinais dispondo, em 2002, apenas de 25 hectares de área de cultivo. Contrariamente, em Espanha, já se cultivam mais de 7000 hectares de plantas aromáticas e medicinais, evidenciando-se em termos quantitativos as seguintes plantas: o açafrão, a alfavaca, a erva-cidreira, a erva-doce, a hortelã-pimenta, o lúpulo e a salva oficial (Grünwald & Jänicke, 2009).

As plantas aromáticas cultivadas em regime biológico são muito ricas em nutrientes e proporcionam excelentes resultados na alimentação, devido ao seu sabor acentuado e ao seu baixo teor de água (Mcvicar, 2002).

Segundo Cunha, Roque & Gaspar (2011) a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação – FAO (Food and Agriculture Organization) tem como objectivo desenvolver medidas de apoio aos agricultores das regiões economicamente desfavorecidas para que estes possam produzir produtos de alta qualidade. Desta forma é possível a cultura de plantas aromáticas e medicinais em modo de produção biológico ou respeitando as regras de protecção integrada.

4. Boas práticas agrícolas de colheita e conservação de plantas

De acordo com as directrizes da OMS (WHO, 2003) é fundamental aplicar boas práticas agrícolas e de colheita (GACP) para plantas medicinais, para garantir a sua qualidade. É importante determinar a hora da colheita ideal de acordo com a qualidade e quantidade dos componentes biologicamente activos da planta, a qual muda consoante o seu estágio de crescimento e desenvolvimento. As práticas de colheita devem ser adequadas a cada uma das espécies de plantas medicinais e parte da planta utilizada (raízes, folhas, flores, frutos, etc.). Os produtores devem ter um conhecimento apropriado sobre a planta medicinal que estão a colher que deve incluir a identificação botânica, as características culturais, exigências ambientais, os meios de colheita e o armazenamento. Durante a colheita é fundamental ter cuidado e garantir que não são colhidos e misturados materiais estranhos, tais como plantas tóxicas e ervas daninhas. A colheita deve ocorrer nas melhores condições possíveis, evitando o orvalho, a humidade e a chuva. Os dispositivos de corte, tais como as máquinas devem ser mantidos limpos para reduzir os riscos de contaminação. A qualidade da matéria-prima pode ser afectada se as plantas forem colhidas junto de estradas ou de

áreas industriais, apresentando depósitos de poeira e metais pesados provenientes dos veículos e outros poluentes. Também é de evitar regiões onde são aplicados agro-tóxicos nos vegetais que contêm altos índices de pesticidas. Colheitas em locais infectados, secagem e/ou armazenamento inadequados podem causar contaminação por microorganismos, principalmente fungos. Todos estes problemas podem causar sérios prejuízos ao consumidor (WHO, 2003).

Segundo a OMS, (WHO, 2003) as matérias-primas devem ser transportadas de imediato para um espaço limpo e seco, colocadas em recipientes bem arejados, para se proceder de imediato à secagem. A sobrecarga ou empilhamento deve ser evitado por poder resultar em compostagem e diminuir a qualidade da matéria-prima. O contacto com o solo deve ser evitado, de modo a minimizar a carga microbiana. De acordo com Cunha & Roque (2008), após a colheita do fármaco deve proceder-se de imediato à sua secagem, de modo a eliminar-se a maior parte da água, e paralelamente, obter a inactivação dos sistemas enzimáticos presentes no conteúdo celular.

Os factores a ter em conta para conseguir um produto de qualidade, dependem da correcta colheita da matéria-prima, da secagem, do processamento, do embalamento e da rotulagem Silva *et al.*, (2009).

É importante conhecer o valor de humidade que cada fármaco vegetal apresenta após a secagem. Esse índice está relacionado com a sua boa preparação e é uma garantia da sua conservação. Uma quantidade excessiva de humidade pode indicar que os produtos foram mal preparados ou se encontram acondicionados inconvenientemente. Portanto, os fármacos vegetais, em circunstâncias capazes de promover alterações dos seus constituintes activos, revelam simplesmente a fraude (Costa, 2001).

Na sua obra Cunha & Roque (2008) referem vários métodos de secagem, tais como:

- Exposição ao ar em atmosfera seca e arejada;

- Espaço bem ventilado à sombra;
- Estufa por ar quente;
- Túneis ventilados com ar quente, em que a planta é colocada em tabuleiros de rede, saindo na extremidade do túnel já seca;
- Raios infra-vermelhos;
- Estufa sob vácuo a 40-45°C.

Destes processos o mais usado é o da estufa, no entanto a secagem em locais bem ventilados, em que a planta é colocada em tabuleiros de rede, à sombra também é eficaz. A temperatura de secagem é, regra geral de 20°C a 40°C para folhas e sumidades floridas. Para cascas e raízes a temperatura deve ser de 50°C a 70°C, de modo que o material vegetal fique com uma quantidade de água de cerca de 5% (o valor limite referido nas farmacopeias situa-se em geral nos 10%). O secador solar também se tem revelado um equipamento adequado à secagem de material vegetal. Com uma temperatura de 30-35°C, durante 48 horas permite uma boa qualidade do material. Para além disso, é uma tecnologia amiga do ambiente, com reduzidos custos de construção e funcionamento.

Já de acordo com Martins (2008), pesquisas recentes mencionam quatro parâmetros fundamentais para a secagem das plantas aromáticas e medicinais: Temperatura e velocidade do ar de secagem; Humidade relativa do ar dentro e fora do sistema de secagem; Temperatura do material; e Pressão estática em função da altura de camada do produto. Para este autor, a secagem ao sol de muitas plantas medicinais e aromáticas é totalmente desaconselhada, por desencadear o processo de fotodecomposição, degradando os componentes químicos e favorecendo alterações de cor, sabor e odor no produto.

Posteriormente à secagem importa considerar a conservação do material vegetal a temperaturas nunca superiores a 20°C, protegido da luz e da humidade, para não se desencadearem alterações dos seus constituintes. Como a humidade facilita a actividade

enzimática e aumenta a probabilidade de se desenvolverem bolores, leveduras e outros microorganismos, os produtos devem conservar-se em ambientes com teores de humidade relativa entre 40 e 60%. O tipo de acondicionamento também é muito importante para conservar os fármacos (Cunha, Silva & Roque, 2006). De acordo com estes autores, só o vidro é realmente hermético, enquanto o cartão, o papel e até mesmo o plástico permitem trocas gasosas entre o fármaco e o exterior, pelo que devem ser evitados, principalmente na conservação de fármacos em pó, aromáticos ou com constituintes muito alteráveis.

Essas alterações que se dão após a colheita, motivadas pelo teor de água, riqueza em enzimas (hidrolases e oxidases), temperatura e luz, vão influenciar a composição final do produto. Durante esta fase, inapropriadas manipulações das plantas podem levar ao desenvolvimento de microorganismos patogénicos, como salmonelas e microorganismos coliformes.

De acordo com Cunha *et al.* (2007), a Farmacopeia Portuguesa VIII, apresenta como valores máximos microbiológicos para preparações galénicas, em que intervém a água fervente (como o caso de tisanas e cozimentos), os seguintes valores:

- Microorganismos aeróbios totais: máximo 10^7 de bactérias e 10^5 de fungos e leveduras por g ou ml;
- *Escherichia coli*: máximo 10^2 por g ou por ml.

Para os fármacos vegetais usados em medicamentos, em que não intervém a água fervente, são exigidos valores menores, como os abaixo discriminados:

- Microorganismos aeróbios viáveis totais: máximo 10^5 de bactérias e 10^4 de fungos e leveduras por g ou por ml;
- Enterobactérias e outras bactérias de Gram negativo: máximo 10^3 de bactérias por g ou por ml.

Existem meios de esterilização das plantas, alguns dos quais proibidos nos dias de hoje, como óxido de etileno, interdito na União Europeia devido à formação de produtos tóxicos (etilenocloridrina e outros). Já o método de esterilização com radiações ionizantes pode originar alterações dos constituintes, pelo que algumas Farmacopeias determinam que seja declarado, o que pode provocar rejeição por parte de alguns clientes.

Capítulo III - Medicamentos à base de Plantas

1. Regulamentação e segurança

De acordo com Cunha, Roque & Gaspar (2011), os medicamentos à base de plantas são objecto de regulamentação em setenta países. No entanto, o controlo legislativo não segue um modelo estruturado e os procedimentos utilizados são diversos. Na Alemanha, a maioria das preparações vegetais são medicamentos que devem ser aprovados pelo Instituto Nacional de Medicamentos e Produtos Médicos antes de a autoridade competente os comercializar. Por essa razão, desenvolveu-se um processo de unificação do estatuto dos medicamentos de origem vegetal em toda a Europa para que seja possível dispor de medicamentos à base de plantas em todos os estados-membros da UE em igualdade de condições (Grünwald & Jänicke, 2009). Ainda que em Portugal, só recentemente tenha sido autorizado um medicamento à base de plantas, noutros Estados-membros, até 30 de Junho de 2007, existiam quatro medicamentos na Alemanha e no Reino Unido, dois na Eslovénia e na Holanda e um na Áustria. Um destes medicamentos autorizados tem como constituinte activo a *Cimicifuga racemosa*, planta originária do Norte dos Estados Unidos e do Canadá, onde os nativos utilizam as raízes para o tratamento de problemas ginecológicos ou relacionados com a menopausa, dores articulares e alívio das dores de parto. Outro dos medicamentos autorizados, contendo plantas de origem europeia, é produzido à base de *Tanacetum parthenium*, originária da região dos Balcãs (Grécia, Albânia), a qual é utilizada como antipirética e para o tratamento de dores de dentes, de estômago e dores de cabeça (Martins, 2008). De acordo com a mesma autora, actualmente já existe um medicamento comercializado na Europa com extracto da planta vulgarmente conhecida como Garra do Diabo (*Harpagophytum procumbens* D. C.), usado como estomáquico e tónico amargo, existindo muitas referências à sua utilização para o

tratamento de artrite, gota, lumbago, mialgias e problemas reumáticos. Já Schippmann (citado por Heller, 2008) refere que a casca da espécie *Prunus Africana* ou *Pygeum africanum* é muito procurada para tratar da hiperplasia benigna da próstata, e por isso, muito importante para o fabrico de alguns medicamentos que são comercializados na Europa.

O uso de medicamentos à base de plantas tornou-se uma alternativa para o consumidor final (DeSmet, 2004, citado por Monteiro, 2008), que por vezes assume que as plantas medicinais são um produto natural inofensivo (Soares & Simón, 1992 citado por Monteiro, 2008). No entanto, devido aos seus princípios activos, estas apresentam actividade farmacológica sobre o organismo, e como tal apresentam efeitos secundários, contra-indicações, toxicidade e interacções com os fármacos convencionais (Guijarro, 2005, citado por Monteiro, 2008). Existem diversos factores a ter em conta, antes da administração destes produtos. “A eficácia e segurança das plantas medicinais podem ser aumentadas ou diminuídas, em função da disposição metabólica do indivíduo e limites de toxicidade dos princípios activos utilizados. Estas situações fisiológicas especiais, englobam por exemplo a gravidez, a terceira idade, os períodos pré e pós-operatório, pacientes com doenças de carácter auto-imune, cancro, doenças degenerativas do sistema nervoso, alterações hormonais e outras situações” (Guijarro, 2005, citado por Monteiro, 2008). Os efeitos secundários podem ser intrínsecos às próprias plantas medicinais, toxicidade ou sobredosagem, às interacções com medicamentos convencionais e/ou reacções alérgicas. De acordo com Fong (2002, citado por Monteiro, 2008) existem outros factores que podem provocar reacções adversas relacionados com a utilização das plantas medicinais, como sendo “identificação incorrecta das plantas, contaminação, substituição e adulteração, variabilidade química, falta de standardização, problemas na produção,

falhas nas boas práticas de produção, entre outros” (Fong, 2002, citado por Monteiro, 2008, p.46).

Bacchi (1996, Farias, 2001 citado por Nascimento *et al.*, 2005) atesta que é indispensável um rigoroso controlo de qualidade dos dados que revelam a origem das plantas medicinais utilizadas nos medicamentos e nas suas especificações técnicas. De acordo com Farias *et al.* (1985), a qualidade das fórmulas farmacêuticas está intimamente ligada à qualidade da matéria-prima. Os problemas mais frequentes na análise de matérias-primas são as adulterações, resultantes em grande parte, da actual forma de exploração das plantas medicinais e da falta de controlo de qualidade. Um factor que pode contribuir para a fraude é a utilização de designações populares, que são muitas vezes regionais, variando de uma localidade para outra. Nomeadamente, diferentes espécies vegetais apresentarem a mesma denominação regional ou uma única espécie ter diferentes denominações populares. Além disso, algumas espécies são morfologicamente semelhantes, tornando muito difícil a sua identificação. Como tal, é imprescindível, que todo o material adquirido pela indústria seja analisado por profissionais, contenha a identificação botânica e a composição química, a fim de garantir a uniformidade do produto final. Através da análise cromatográfica dos produtos comercializados, constata-se muitas vezes que existe uma completa desigualdade na composição química de um mesmo produto.

Já Costa (2001) destaca um conjunto de determinações qualitativas e quantitativas utilizadas na análise geral dos fármacos vegetais que tem o objectivo de contribuir para o reconhecimento da planta e caracterização dos seus principais constituintes ou marcadores de qualidade, nomeadamente, permitir a sua identificação, verificar o seu estado de pureza e a natureza de certas eventuais fraudes.

Segundo Ferraro (2006) a qualidade de um medicamento fitoterápico depende sempre de vários factores, como sejam, a variabilidade da matéria-prima, a identificação do fármaco

vegetal, seja uma planta silvestre ou de cultivo. A qualidade, eficácia e segurança do mesmo estão intimamente relacionados com as condições climáticas e edáficas do material vegetal, a parte da planta que foi colhida, a época de colheita, e a ontogenia da planta.

Para Gobbo-Neto & Lopes (2007) o factor mais importante que influencia o conteúdo dos metabolitos secundários é a época em que a droga vegetal é recolhida. Como a quantidade e a natureza dos constituintes activos não é constante durante todo o ano, subsistem variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabolitos secundários, como óleos essenciais, ácidos fenólicos, flavonóides, cumarinas, saponinas, alcalóides, taninos, entre outros.

De acordo com Brasil (2000, citado por Toledo *et al.*, 2003) existem vários requisitos de qualidade que devem ser avaliados, como sejam o teor de substância activa, actividade farmacológica e toxicológica do material vegetal. Outros aspectos importantes a ter em conta, são a carga microbiana, contaminação química por pesticidas e metais pesados, a presença de matérias estranhas, como terra, areia, partes de outros vegetais e insectos.

2. Regras na preparação de medicamentos à base de plantas

Como é aludido por Cunha, Roque & Gaspar (2011), a Organização Mundial de Saúde preparou um guia a ter em conta na preparação de medicamentos à base de plantas, onde são focados diversos pontos fulcrais. Por um lado, a matéria-prima vegetal deve indicar a origem botânica, incluindo o género e a espécie, assim como a parte da planta utilizada (folha, flor, casca, raiz, entre outros). As monografias de plantas medicinais inscritas nas Farmacopeias modernas indicam vários ensaios capazes de garantir a qualidade, como a determinação das características organolépticas e físicas, indicação do teor de elementos estranhos, perda de peso por secagem, exame macroscópico da matéria-prima vegetal e

exame microscópico do seu pó, assim como a menção aos seus principais constituintes activos pelo emprego da cromatografia em camada fina.

No caso de preparações galénicas de plantas, deve-se descrever o método de fabrico e as substâncias adicionadas durante o mesmo. Por outro lado, importa informar acerca da identificação, dosagem ou, sempre que possível, o “perfil cromatográfico” da planta. O produto acabado deve conter indicações sobre a fórmula, a quantidade dos excipientes, o método de identificação do constituinte activo e a quantificação do material vegetal. Na embalagem de venda é necessário, além disso, existir referência aos indicadores sobre a estabilidade física e química do produto, assim como a validade do mesmo.

Ainda para os mesmos autores é necessário partilhar informações sobre contra indicações e interacções entre os medicamentos convencionais e os medicamentos à base de plantas, como é o caso do Hipericão (*Hypericum perforatum*) que pode diminuir a concentração sanguínea dos contraceptivos orais e de outros medicamentos. Para tal, e com o intuito de provar e garantir a eficácia dos medicamentos à base de plantas, revela-se fundamental um grande empenho e colaboração de todos os responsáveis (botânicos, farmacognosistas, farmacologistas, toxicologistas, equipas de saúde e fabricantes destes medicamentos). Para estes autores, é também essencial que os fabricantes invistam mais no controlo de potenciais contaminantes. Uma vez que as plantas estão expostas a um grande número de contaminantes provenientes do meio ambiente, é de importância extrema que sejam efectuadas análises rigorosas aos metais pesados, compostos orgânicos tóxicos, pesticidas e resíduos de fumigação.

A qualidade, a eficácia e a segurança dos produtos à base de plantas depende, em grande medida, da qualidade da matéria-prima, quer seja uma simples infusão ou um medicamento à base de plantas. Neste contexto, torna-se imperativo que haja um maior investimento nos

parâmetros de qualidade, um maior conhecimento da composição química, determinação dos constituintes activos e realização de ensaios químicos de qualidade (Costa, 2001).

De acordo com Laerte Dall'Agnol (s.d.), para a indústria farmacêutica é fundamental a qualificação dos fornecedores de plantas aromáticas e medicinais com conhecimentos de Boas Práticas Agrícolas e Garantia de Qualidade. É de importância extrema seguir um processo bem definido de aquisição das matérias-primas, considerando os critérios de qualidade, logística, pontualidade de entrega e preço. É essencial, para qualquer organização, a determinação de especificações técnicas para todos os produtos, a implementação do manual de qualidade e a realização de auditorias ao sistema para verificação dos requisitos de higiene e segurança alimentar. Desta forma, torna-se possível o estabelecimento de objectivos e planos de acção (visando a implementação de acções correctivas, preventivas, e posterior verificação da sua eficácia), procedimentos que sustentam o trabalho desta indústria, no sentido de estudar mecanismos que minimizem os riscos de falsificações e contaminações (Laerte Dall'Agnol, s.d.).

3. Directrizes sobre medicamentos de uso tradicional

De acordo com Martins (2008), a Fitoterapia é de novo um ramo da Terapêutica com muito interesse, tendo o desenvolvimento científico e técnico permitido demonstrar a eficácia e segurança terapêutica de muitas plantas medicinais, assim como a possibilidade de preparação de formas galénicas com teores padronizados de princípios activos. Vários países europeus, como a Alemanha, França e Inglaterra, têm vindo a incluir várias plantas medicinais nas suas farmacopeias. Dentre esta destaca-se o caso da Comissão E, que tem elaborado importantes monografias, tendo publicado, nos últimos dezanove anos, 410 monografias sobre 324 plantas. Estas incluem aspectos tão variados e fulcrais como “as descrições das plantas e respectivos constituintes, propriedades farmacológicas, indicações

terapêuticas, óleos, contra-indicações, efeitos secundários, interacções, doses recomendadas, requisitos de controlo da qualidade e condições recomendadas de armazenamento” (Martins, 2008, p. 102).

Ainda de acordo com a mesma autora (2008), sem as normas específicas estabelecidas pela Directiva 2004/24/CE, a maioria dos produtos de uso tradicional não conseguiria cumprir os requisitos de eficácia e segurança que devem demonstrar os medicamentos para obterem uma autorização de introdução no mercado (AIM). Esta normativa veio complementar a Directiva 2001/83/CE, através do aditamento de novas definições – medicamento tradicional à base de plantas, medicamento à base de plantas, substâncias vegetais e preparações vegetais.

Por sua vez, Grünwald & Jänicke (2009) referem que as plantas medicinais são submetidas a um processo de autorização integral para adquirirem a categoria de medicamentos, tendo que demonstrar a sua eficácia e rigor cientificamente. A qualidade deste tipo de medicamentos deve ser provada de acordo com as monografias vigentes na farmacopeia europeia ou na dos estados-membros. A sua segurança está garantida pela longa tradição de aplicações bem-sucedidas. Esta directiva refere-se apenas a preparados elaborados com substâncias vegetais, vitaminas e sais minerais. De acordo com os critérios desta directiva todos os medicamentos que forem autorizados na União Europeia devem incluir a indicação no prospecto e na embalagem, assinalando que se trata de um medicamento tradicional.

Os produtos vegetais que não são medicamentos e cumprem os critérios estabelecidos pela legislação sobre alimentos, também podem ser comercializados. Existem plantas medicinais como a camomila, o chá, e o poejo, que em alguns países europeus se regem tanto pela legislação sobre alimentos como pela de medicamentos. Especiarias, como o gengibre e a curcuma são outro exemplo da difícil classificação das plantas, que podem

considerar-se tanto medicamento como alimento. Em Portugal, existe uma enorme tradição ao nível do consumo das plantas, as quais estão sujeitas a um duplo regime legal, podendo ser comercializadas como género alimentício ou como medicamento. Por outro lado, segundo a Associação Portuguesa de Alimentação Racional e Dietética, cerca de 65% dos suplementos alimentares contendo plantas são comercializados em farmácias e parafarmácias, constituindo o principal canal de escoamento e consumo de suplementos alimentares (Grünwald & Jänicke, 2009).

É fundamental que estas orientações ajudem na implementação de um sistema de higiene e segurança alimentar baseado no *Codex Alimentarius* - Código de Boas Práticas e Princípios Gerais de Higiene - para garantir a qualidade das plantas aromáticas e medicinais, utilizadas como fonte de medicamentos. Este é um sistema preventivo que procura a produção de produtos inócuos. Sustenta-se em princípios técnicos e científicos, aplicados à produção, transformação, rotulagem e distribuição alimentar, oferecendo uma abordagem do controlo de perigos que impede a contaminação por agentes físicos, químicos, ou biológicos, durante a produção, embalamento, armazenamento ou transporte (WHO, 2003).

Capítulo IV – Plantas Aromáticas

1. Definição

Segundo Cunha, Ribeiro e Roque (2009), as plantas aromáticas caracterizam-se por possuírem, em estruturas especializadas, óleos essenciais utilizados nas indústrias farmacêutica e alimentar. Outrora, deu-se preferência às plantas aromáticas espontâneas, por serem aquelas que o homem tinha mais facilmente à sua disposição. No entanto, esta prática está praticamente abandonada nos dias de hoje, passando a existir um interesse maior pelo cultivo de diversas espécies. As plantas aromáticas têm sido sujeitas a diversos estudos, a fim de determinar a natureza e a quantidade dos seus constituintes, o que levou à verificação da existência de variedades químicas.

“Estas correspondem a populações morfologicamente idênticas, mas quimicamente diferentes dentro de uma dada espécie vegetal, o que indica a presença de fenótipos semelhantes, mas de diferentes genótipos. Assim, a selecção de uma determinada variedade originará, quando cultivada, material vegetal de composição mais uniforme, o que é muito importante para a obtenção dos respectivos óleos essenciais, à obtenção de medicamentos à base de plantas aromáticas e ao isolamento de moléculas activas ou de compostos a serem utilizados na semi-síntese de medicamentos” (Cunha, Ribeiro e Roque, 2009, p.34).

A nossa flora abrange imensas espécies aromáticas. Em particular, a família *Lamiaceae* engloba diversas espécies com elevada importância na produção de óleos essenciais. Todas as espécies de *Lavandula* são aromáticas, produzindo os seus óleos essenciais em estruturas secretoras especializadas, denominadas tricomas glandulares. Os seus óleos essenciais têm um papel de extrema importância na adaptação das plantas ao meio ambiente, auxiliando no processo de polinização e de protecção da planta contra

herbívoros e agentes patogénicos (Harborne, 1993, citado por, Zuzarte, 2007). Para além disso, são deveras importantes em várias indústrias, por representarem uma importante fonte de bioactivos. De acordo com Zuzarte (2007) industrialmente as espécies mais utilizadas são *Lavandula angustifolia* Mill., *L. latifolia* Medik., *L. stoechas* e *L. x intermedia* Emeric ex Loisel, sendo muito proveitosas na nossa flora, por serem aromáticas, medicinais e por terem muito interesse económico. Para além disso, são objecto de estudos que podem contribuir para uma valorização e comprovação científica das suas potencialidades. Neste sentido, revela-se cada vez mais importante, nesta área, a conservação da biodiversidade e variabilidade genética das plantas aromáticas, condimentares e medicinais.

O crescente emprego dos produtos naturais como matéria-prima indispensável a uma indústria cada vez mais diversificada, e a procura de novos compostos levou ao estudo pluridisciplinar de numerosas plantas aromáticas, incluindo estas espécies, para que todos os seus efeitos sejam claramente comprovados, apoiados em bases científicas e livres de toda a fraudulência e superstição popular (Zuzarte, 2007).

2. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são princípios activos vegetais líquidos, que libertam um aroma característico da planta. Trata-se de combinações de substâncias (e.g. terpenos e fenilpropanos) que se encontram, por exemplo, na erva-doce, no funcho, na salva, na hortelã, nas agulhas de pinheiro, no eucalipto, e em muitas outras plantas (Grünwald & Jänickcke, 2009). A indústria raramente utiliza uma planta inteira, mas sim a parte da planta que é mais rica pelos seus constituintes (Cunha, Ribeiro e Roque, 2009).

Na maioria dos casos, as partes aéreas floridas da planta são as mais ricas em óleos essenciais, podendo, no entanto, extrair-se de diversos órgãos da planta, várias essências.

No entanto, os óleos essenciais também podem ser encontrados noutros órgãos vegetais, designadamente raízes, rizomas, caules, cascas, folhas, frutos e sementes sendo produzidos em estruturas secretoras resultando da hidrólise de heterósidos (Bruneton, 1991, citado por Zuzarte, 2007).

Segundo Cunha, Ribeiro & Roque (2009), a destilação e a expressão são os processos de obtenção industrial de óleos essenciais. De acordo com as normas da (ISO) International Standard Organization on Essencial Oils, ISO 9235 (1997) da ISO/TC 54 e da Norma Portuguesa NP90 (1987) do IPQ-CT 5, a designação de óleo essencial está reservada para os produtos que se obtêm exclusivamente por destilação de matéria vegetal, com ou sem vapor de água, ou por processos mecânicos a partir do epicarpo de frutos de espécies do Género *Citrus*. A tecnologia mais habitual da destilação é a **hidrodestilação**. Para este método pode utilizar-se o aparelho *Clevenger*. A extracção dos compostos voláteis é realizada por arrastamento pelo vapor de água, seguida de passagem do vapor por condensador apropriado, originando a sua transformação em líquido, que em recipiente “tipo florentino”, por acção da gravidade, separa a fase aquosa do óleo essencial. O destilado é assim constituído por óleo essencial e por água aromatizada (hidrolato da planta). Na indústria começa a ser usado um outro método, o da **hidrodifusão**, que é baseado na utilização de vapor a baixa pressão (0,05-0,1 bar). Este, ao ser injectado pelo topo da caldeira e acelerado apenas pela acção da gravidade, promove a ruptura das membranas celulares da planta, por diferença de pressão osmótica e a difusão dos constituintes dos óleos essenciais (Cunha, Ribeiro & Roque, 2009).

Segundo os mesmos autores as Farmacopeias, nas respectivas monografias de óleos essenciais, definem o óleo indicando a espécie de onde é obtido, as suas características (aspecto), a identificação do óleo essencial por cromatografia de camada delgada e pelos valores da densidade, do índice de refracção, do ângulo de rotação óptica, de óleos gordos

e óleos resinificados e do índice de ácido. Indica, ainda, o perfil cromatográfico obtido por cromatografia em fase gasosa e como deve ser conservado.

Para extractos aromáticos que se alterem facilmente (ex: alteráveis pelo calor) usa-se outro método de extracção com dióxido de carbono líquido (CO₂ supercrítico), que resulta na obtenção de extractos semelhantes à composição da planta. Este processo foi utilizado para descafeinar o café, preparar extractos de lúpulo para a indústria cervejeira ou para retirar a nicotina do tabaco, inicialmente. Nos dias de hoje, obtém-se extractos de gengibre, paprica e alecrim através deste processo (Cunha, Ribeiro & Roque., 2009).

2.1. Actividade Biológica de Óleos Essenciais

Os óleos essenciais, pelas suas propriedades antifúngicas, constituem uma matéria de estudo notável na busca de terapias alternativas para combater o aumento da taxa de incidência e gravidade das infecções fúngicas, nomeadamente em doentes com o sistema imunitário enfraquecido, como pacientes debilitados, transplantados ou imunodeprimidos (Zuzarte, 2007).

De acordo com Lima *et al.*, (2006), os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, e estão relacionados com diversas funções necessárias para a sobrevivência vegetal, exercendo um papel fundamental na defesa contra microrganismos. Foi estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedade antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas.

A actividade biológica dos óleos essenciais tem-se mostrado dependente da composição química, tendo sido mais reportados os seus constituintes timol e carvacrol, para além de citral, cineol, eugenol, eucaliptol, e outros responsáveis pelas propriedades anti-sépticas, antibacterianas, antifúngicas e anti parasíticas (Craveiro *et al.*, 1981; Souza *et al.*, 2005, citado por Lima *et al.* 2006).

Cunha *et. al.* (2008) salientam que o uso de técnicas de controlo de qualidade dos óleos essenciais é muito relevante, pois estas também são muito usadas em produtos cosméticos e dermatológicos. Algumas matérias-primas obtidas das plantas aromáticas são utilizadas na cosmética, tais como concretos, absolutos e pomadas florais, para que o cosmético tenha uma aceitação agradável, mascarando por vezes odores desagradáveis de alguns dos constituintes da preparação, e permitindo que o cosmético tenha uma determinada acção farmacológica. Nos produtos dermatológicos, determinados óleos essenciais são usados pela sua actividade sobre o tecido cutâneo, como acção anti-séptica, anti-inflamatória e antipruriginosa.

Capítulo V – Controlo de Qualidade

1. Alguns testes e técnicas

Existem alguns testes básicos que se revelam fundamentais no controlo de qualidade. Estes representam um dos muitos elementos que podem ajudar a confirmar a identidade de uma amostra. (WHO, 1998). Os objectivos destes testes são:

- Verificar a identidade da amostra, utilizando uma gama limitada de reagentes facilmente disponíveis, quando a rotulagem e os atributos físicos dão origem à dúvida;
- Proporcionar um meio possível de confirmação de identidade de uma amostra;
- Indicar se ocorreu degradação em algumas substâncias que podem ter-se desenvolvido em condições adversas.

Por sua vez, a Farmacopeia Portuguesa VIII (2005) descreve a utilização de técnicas cromatográficas para a identificação dos constituintes marcadores de qualidade e autenticidade dos óleos essenciais, para a detecção de adulterações por adição de óleos estranhos, entre outros. Esta metodologia é simples e pode ser usada facilmente em pequenos laboratórios.

Cunha (2010) refere que a **cromatografia de camada fina** é um método de simples execução e de baixo custo operacional. Esta “é uma técnica de separação na qual uma fase estacionária, constituída por um material apropriado, é espalhada numa camada fina e uniforme sobre um suporte (placa) de vidro, de metal ou de plástico. As soluções em análise são aplicadas sobre a placa antes do desenvolvimento. A separação assenta em mecanismos de absorção, de partilha ou de troca de iões ou na combinação destes mecanismos e efectua-se por migração (desenvolvimento) de soluções (soluções em

análise) através da camada fina (fase estacionária) num solvente ou mistura de solventes apropriada (fase móvel) ” (Farmacopeia Portuguesa VIII, 2005, p.41).

Por sua vez, a **cromatografia de fase gasosa** é uma das técnicas cromatográficas mais utilizadas na análise de óleos essenciais, com alta resolução, sensibilidade e adequação a análises quantitativas (Cunha, 2010). A Farmacopeia Portuguesa VIII (2005, p.42) realça que “esta é uma técnica de separação cromatográfica baseada na distribuição diferencial da mistura entre duas fases não miscíveis, uma fase estacionária contida numa coluna e um gás vector, como fase móvel, que atravessa a fase estacionária. Esta metodologia requer equipamento mais sofisticado que nem sempre é possível ter num pequeno laboratório.

2. Técnicas de Controlo de Qualidade

Segundo Parthik, Patel & Patel (2011), os recentes avanços que ocorreram nos processos de isolamento, purificação e elucidação estrutural de substâncias naturais tornaram possível estabelecer estratégias adequadas para a análise da qualidade e do processo de padronização de preparações à base de plantas, a fim de manter, tanto quanto possível, a homogeneidade do extracto da planta. Entre outros, e conforme já mencionado, a cromatografia em camada fina, cromatografia gasosa, cromatografia líquida, espectrometria de massas, espectrometria de infravermelho, ultravioleta / visível, usados sozinhos ou em combinação, podem ser empregues com sucesso na padronização e controle da qualidade, tanto da matéria-prima como dos medicamentos à base de plantas.

Gaedcke, Steinhoff & Blasius (2003) referem que, devido à heterogeneidade natural, a qualidade da matéria-prima vegetal obtida em colheitas selvagens mostra grandes flutuações. Assim, o cultivo das plantas medicinais mais importantes tem sido consideravelmente promovido nos últimos anos, parecendo ser a única forma de ir ao encontro da crescente exigência da qualidade consistente dos produtos vegetais, tendo em

conta condições ambientais controladas. Segundo estes autores, um pré-requisito muito importante para a padronização bem-sucedida é a disponibilidade de procedimentos analíticos selectivos e reprodutíveis para a dosagem de constituintes relevantes.

Conforme aludido por Gaedcke, Steinhoff & Blasius (2003), não há dúvidas de que a qualidade das plantas medicinais tem aumentado consideravelmente com o aumento do cultivo. No entanto, mesmo plantas obtidas pelo cultivo, mostram grandes variações nos espectros de constituintes, não apenas de lote para lote, mas, acima de tudo, por ano de colheita. Por isso, apesar do cultivo controlado, é sempre aceite uma certa variabilidade natural. Devendo-se ter em conta que os esforços de padronização devem ser sempre o foco dos parâmetros de qualidade, relevantes para o extracto resultante e o sucesso do produto medicinal final.

As especificações para as plantas incluem os convencionais itens farmacopeicos - identidade, pureza, conteúdo - avaliação de impurezas, testes a pesticidas, aflatoxinas, metais pesados, contaminações microbiológicas e radioactividade.

2.1. Testes de Identificação

Segundo Gaedcke, Steinhoff & Blasius (2003) o teste mais importante é o teste de identificação. Além do exame macroscópico e, se necessário, também microscópico, a identidade é principalmente estabelecida por TLC (Thin Layer Chromatography), cromatografia gasosa ou HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Desta forma, através do teste de identificação completo, assegura-se que estão presentes, não só os constituintes com actividade terapêutica conhecida e substâncias marcadoras, como também os constituintes concomitantes. Adicionalmente, adulterantes e misturas de outras plantas também seriam detectados e excluídos.

2.2. Ensaios de Controlo de Qualidade

No que diz respeito aos ensaios de controlo de qualidade, existem três tipos diferentes aplicados a diferentes produtos vegetais:

- **Produtos Vegetais com (grupos de) constituintes com actividade terapêutica conhecida**

De acordo com Gaedcke, Steinhoff & Blasius (2003) o controlo de qualidade quantitativo das plantas pode ser conseguido através da análise dos constituintes com actividade terapêutica conhecida. Os valores mínimos que têm que ser atingidos e os métodos a serem aplicados estão estabelecidos nas especificações para o extracto, ou podem ser derivados da quantidade de extracto. Se a planta está coberta pela Comissão E, pela ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy) ou Monografias da OMS, o método aplicado para a determinação da dose diária estipulada pela monografia também deve ser tida em conta. Se o conteúdo requerido na planta não é atingido, o respectivo lote pode ainda ser misturado com outro lote com um conteúdo mais elevado para que o conteúdo necessário possa ser assegurado no extracto resultante.

- **Produtos Vegetais com (grupos de) constituintes activos conhecidos**

Constituintes que não são aceites como terapeuticamente activos mas que contribuem para a eficácia das plantas podendo ser analisados da mesma forma que os constituintes com actividade terapêutica conhecida.

- **Produtos Vegetais em que não são conhecidos (grupos de) constituintes com actividade terapêutica reconhecida.**

Conforme aludido por Gaedcke, Steinhoff & Blasius (2003) o controlo de qualidade é muito mais complexo em plantas ou preparações de plantas em que os efeitos terapêuticos são conhecidos mas não há conhecimento científico sobre os constituintes activos, o que significa que estes constituintes não podem ser detectados analiticamente.

Exemplos deste tipo de plantas são: *Orthosiphonis folium*, *Echinaceae angustifoliae radix* e *Valerianae radix*. A sua qualidade só pode ser assegurada com o auxílio de substâncias marcadoras/indicadoras, isto é, constituintes que devem ser característicos para a planta e fáceis de detectar analiticamente. Além disso, eles têm que ser extraíveis pelo solvente de extracção a ser usado. Marcadores comuns são, por exemplo, a sinensetina em *Orthosiphonis folium*; echinacoside em *Echinaceae angustifoliae/pallidae radix* e ácidos valerénicos em *Valerianae officinalis radix*.

2.2.1. Testes de Pureza

De acordo com Gaedcke, Steinhoff & Blasius (2003), é fundamental, para além de testar a matéria estranha (da própria ou outras plantas) e outras impurezas (areia, materiais de embalagem), realizar testes para impurezas especiais, que se revestem de grande importância. Actualmente, e de acordo com a bibliografia encontrada, estes incluem: testes de contaminação microbiológica; pesticidas; metais pesados (chumbo, cádmio, mercúrio); aflatoxinas (M1, M2, G1 e G2); e, se necessário, micotoxinas e radioactividade.

Segundo estes autores, se os resultados dos testes para impurezas especiais não forem avaliados individualmente mas na totalidade, muitos lotes de matéria-prima vegetal têm que ser rejeitados, apenas devido às impurezas especiais intoleráveis, mesmo antes de parâmetros de qualidade mais importantes (como a identidade, pureza e conteúdo) serem testados.

2.2.2. Métodos de Referência

De acordo com Silva (comunicação pessoal, Junho de 2005) a autenticidade de uma droga vegetal é determinada por referência a monografias constantes em Farmacopeias (e.g. Farmacopeia Portuguesa, Farmacopeia Europeia) ou em outras publicações oficiais

reconhecidas. Os métodos de farmacognosia incluem os métodos gerais de análise comuns a todos os fármacos e métodos específicos para análise de drogas vegetais, incluindo entre outros a descrição das características organolépticas e botânicas.

3. O uso da genética na identificação de espécies e substâncias vegetais

Tendo em conta a larga variedade taxonómica das plantas e a grande correlação entre diferentes espécies de plantas (Chen *et al.*, 2010), os métodos químicos e organolépticos tradicionais poderão ser frequentemente difíceis de aplicar, especialmente em produtos já processados, derivados de partes de plantas ou sob a forma de pó (Li *et al.*, 2011). Desta forma, a tecnologia molecular pode proporcionar um acréscimo de confiança na identificação das espécies (Li *et al.*, 2011). Nesta perspectiva, em 2003, o termo “Código de Barras de ADN” (DNA Barcode) foi referido pela primeira vez por Paul Herbert, ganhando a atenção da comunidade científica a nível mundial (Chen *et al.*, 2010).

De acordo com Li *et al.* (2011), os Códigos de Barras de ADN são curtas sequências de uma secção *standard* do ADN, usadas para identificar a espécie de uma determinada amostra biológica. Este procedimento consiste na extracção total do ADN e na amplificação e sequenciação das regiões correspondentes aos códigos de barras.

Para explicar esta tecnologia, temos de recuar até 1983, quando Kary Mullis descobriu uma forma de usar a maquinaria celular de replicação do ADN para produzir rapidamente milhões de cópias de uma sequência específica. Deu assim origem à amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction), permitindo a produção em massa de uma pequena quantidade de material genético (Lewis, 2001).

De acordo com Lewis (2001), todas as fases de amplificação por PCR são controladas usando um aparelho automático que controla todas as mudanças de temperatura e os

períodos de tempo de cada fase, gerando um aumento exponencial de sequências de ADN até ao ponto de saturação dos reagentes ou do tempo de vida da enzima.

Esta técnica tornou-se indispensável para todas as situações em que é necessário proceder a uma identificação em que uma pequena quantidade de material genético forneça informação quando produzida em massa (Lewis, 2001). É o caso dos Códigos de Barras de ADN, os quais, têm sido aplicados no reconhecimento de animais, plantas e fungos (Chen *et al.*, 2010).

Tendo em conta o crescimento do mercado de plantas medicinais e aromáticas, os produtos são frequentemente sujeitos a adulteração, a qual pode ser accidental – pela substituição da matéria-prima por espécies próximas correlacionadas – ou intencional – usando matérias não relacionadas. A adulteração acontece principalmente como consequência da ausência de caracteres morfológicos distinguíveis entre espécies diferentes, da existência de plantas com nomes comuns semelhantes ou da substituição de matérias economicamente valiosas por outras mais baratas (Li *et al.*, 2011). Para controlar este problema, a comunidade científica tem-se esforçado para encontrar regiões de ADN adequadas para marcar cada espécie, standardizando o uso internacional de códigos de barras de ADN. Até Fevereiro de 2011, foram registados mais de 1 100 000 relativos a 95 000 espécies no *The Barcode of Life Data Systems* e, ao longo dos últimos 10 anos, mais de 180 000 sequências de plantas foram gravadas no Genbank (Li *et al.*, 2011).

De acordo com Li *et al.* (2011), um código de barras de ADN apropriado deve apresentar:

- Elevada universalidade, podendo ser sequenciado rotineiramente por várias espécies de plantas;
- Elevada qualidade das sequências, propiciando a produção de sequências com o mínimo de pares-base ambíguos;
- Elevada discriminação, possibilitando a distinção da maioria das espécies.

O estudo destes autores (Li *et al.*, 2011) apresentou conclusões úteis para o desenvolvimento e expansão desta tecnologia, relativamente ao uso de diversos códigos de barras de ADN, expondo prós e contras da aplicação de cada uma das regiões estudadas na identificação de espécies de plantas.

Por sua vez, Chen *et al.* (2010) fizeram um estudo em que procuravam validar a região ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) como um novo código de barras de ADN para a identificação de espécies de plantas medicinais. Foram estudadas 8 557 plantas, pertencentes a 5 905 espécies, para testar sete regiões de ADN, concluindo que o ITS2 seria um poderoso código de barras de ADN na autenticação de amostras vegetais, apresentando altas taxas de sucesso em cada fase do estudo.

Li *et al.* (2011) salienta que este método de identificação das plantas medicinais tem sido desenvolvido há mais de uma década, com vantagens reconhecidas, face a outros métodos bioquímicos. A Farmacopeia Chinesa e a sua nota suplementar *online*, apresentam o uso de códigos de barras de ADN como um método standard para a identificação de algumas medicinas tradicionais chinesas.

Capítulo VI – Investigação Laboratorial

Dado o carácter deste estudo, bem como a diversidade de materiais e métodos utilizados, revelou-se difícil a organização de toda a informação necessária de uma forma unitária e integrada. Neste sentido, optou-se por dividir a mesma, tendo-se apresentado os dados e discutido os resultados de acordo com cada técnica.

1. Material vegetal estudado e sua importância

O material seleccionado para estudo existe em abundância no Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros. São plantas conhecidas e comercializadas tradicionalmente em Portugal, com elevado valor económico e científico.

O objectivo principal deste trabalho experimental consiste na identificação de alguns componentes, responsáveis pela actividade farmacológica destas plantas, através de uma metodologia simples e passível de ser usada num pequeno laboratório. As plantas analisadas são:

- a) *Crataegus monogyna* L. (Pilriteiro ou Espinheiro alvar);
- b) *Thymus zygis* L. (Tomilho ou Sal-da-terra);
- c) *Lavandula luisieri* L. (Rosmaninho);
- d) *Hypericum perforatum* L. (Hiperião Kneip ou Erva de São João);
- e) *Hypericum androsaemum* L. (Hiperião-do-Gerês).

a) *Crataegus monogyna* L. (Pilriteiro ou Espinheiro alvar)

O *Crataegus monogyna* L. é um arbusto da família das Rosáceas, que oscila entre 1,5 e 4 m de altura e apresenta ramos muito espinhosos e madeira muito rija. As folhas têm as bordas serradas e as flores são brancas (Grünwald & Jänicke, 2009). A floração acontece

em Maio e Junho e cresce em zonas de mato bem iluminadas no Continente, Centro e Sul da Europa e do Canadá.

Inicialmente, as partes utilizadas pela medicina tradicional foram as Bagas (pseudofrutos secos - pilritos), sob a forma de tintura, na terapêutica cardíaca pelo médico irlandês Dr. Green (Mills e col., 2000, citado por Cunha & Roque, 2008). Mais tarde, devido ao aumento da incidência das doenças cardíacas, e apoiado por ensaios farmacológicos e clínicos, passou a utilizar-se a folha com flor (Cunha & Roque, 2008). Das folhas e flores brancas são obtidos, principalmente, extractos hidroalcoólicos (relação planta/extracto 5 a 7:1) e tinturas, com reconhecida eficácia terapêutica (Cunha *et al.*, 2007). Segundo Proença da Cunha (2010) os seus constituintes bioactivos incluem procianidinas oligoméricas (catequinas e epicatequinas), flavonóis como o hiperósido (quercitina-3-O-galactósido) e nas flores vitexina e a 2''-O-ramnosilvitexina.

Em alguns estudos foi verificado o seu efeito vasodilatador, evidenciando que os flavonóides bloqueavam a vasoconstrição por inibirem a enzima de conversão de angiotensina. Para além disso, os flavonóides causam dilatação dos vasos periféricos e coronários. A dilatação dos vasos reduz as resistências vasculares periféricas e aumenta o fluxo sanguíneo coronário. Estas acções são importantes para o seu uso na insuficiência cardíaca, na angina e na hipertensão (Cunha, 2010).

De acordo com o mesmo autor, na medicina tradicional, o pirliteiro é usado como cardiotónico e como sedativo. Também é utilizado para prevenir a destruição do colagénio, diminuir a inflamação e a fragilidade dos capilares. Por vezes, é ainda referido como tendo propriedades antioxidantes e de diminuição do colesterol. No entanto, as indicações suportadas pelos ensaios clínicos são a insuficiência cardíaca e a hipertensão. Apresenta outros efeitos a nível do sistema cardiovascular como o aumento do fluxo sanguíneo

coronário, efeito ionotrópico e cronotrópico positivos, aumenta a tolerância miocárdia à deficiência de oxigénio. Também demonstra actividade hipocolesterolémica antioxidante.

Para Cunha (2010), como efeitos secundários verifica-se que pode induzir dores de cabeça, sudção, sonolência, vertigens, palpitações, agitação e sintomas gastrointestinais. Por outro lado, interfere com outros medicamentos vasodilatadores, podendo potenciar ou inibir as acções de outros fármacos usados no colapso cardíaco, hipertensão, angina ou arritmias.

b) *Thymus zygis* L. (Tomilho ou Sal-da-terra)

O *Thymus zygis* L. é um subarbusto da Família das Labiadas, espontâneo, muito característico do Centro de Portugal Continental (Cunha, Silva & Roque, 2006).

Segundo a Farmacopeia Portuguesa VIII (2005), a folha do *Thymus zygis* apresenta um comprimento de 1,7 a 6,5 mm e uma largura de 0,4 a 1,2 mm. É aciculada a linear-lanceolada e os bordos são muito enrolados na face abaxial. Ambas as faces do limbo são de verde a verde acinzentado, com uma nervura média, corada por vezes de violeta; os bordos, em peculiar ao nível da parte basal, têm longos pêlos brancos. As flores secas são muito semelhantes às do *Thymus vulgaris* que em Portugal só existe de cultura (Cunha, Silva & Roque, 2006). De acordo com os mesmos autores, a Farmacopeia Portuguesa VIII (2005) admite o emprego destas duas espécies, e até mesmo a mistura de ambas. No entanto, as folhas e flores, previamente secas, devem conter no mínimo 12ml/kg do óleo essencial, dos quais 40% são de timol e carvacrol (cada um C₁₀H₁₄O) no fármaco seco (Cunha & Roque, 2008).

A Farmacopeia Portuguesa VIII (2005) identifica o fármaco por exame macroscópico e microscópico do pó e através do perfil obtido por cromatografia em camada fina. É importante fazer sempre um controlo da planta em relação à composição do seu óleo essencial, pois algumas espécies não satisfazem o teor em fenóis por apresentarem diversos

quimiotipos. Para além disso, existem em Portugal ainda as subespécies *sylvestris* e *zygis*, pelo que este controlo se revela essencial para as distinguir.

De acordo com Grünwald & Jänicke, (2009) a ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy) recomenda a utilização do tomilho em caso de inflamação das vias respiratórias, bronquite e tosse convulsa, favorecendo a expectoração (devido aos terpenos). Aconselha o uso desta planta também como terapia para a gastrite e contra a halitose, devendo-se o seu efeito antiespasmódico aos flavonóides. Já o timol, contido no óleo essencial, tem um forte efeito antimicrobiano contra diferentes bactérias e fungos. Além de favorecer a circulação possui, ainda, boas propriedades antioxidantes.

Tal como Cunha, Ribeiro & Roque (2009) referem, o óleo essencial deve ser aplicado externamente em formulações, para tratar infecções cutâneas, afecções da orofaringe, dores reumáticas e sinusites. É, também, usado na aromatização de alimentos pré-preparados e pode ser empregue na composição de alguns perfumes e detergentes. No entanto, os mesmos autores referem que o óleo essencial pode provocar reacções alérgicas, sobretudo em crianças, salientando, ainda, que doses elevadas num uso interno podem provocar convulsões.

c) *Lavandula luisieri* L. (Rosmaninho)

A *lavandula luisieri* L. é um subarbusto perenifólio da família das Lamiáceas (Labiadas), apresenta entre 20 a 60 cm de altura, tomentoso, muito aromático, com folhas de 0,8 a 3,8 cm, lineares, com espigas alongadas, menos vezes ovóides, sésseis ou mais ou menos pedunculatas. Enquanto as brácteas férteis são cordado-reniformes, mais altas que largas, com nervuras proeminentes e bem reticuladas, as brácteas estéreis são apicais, geralmente púrpureas ou lilacíneas, e os cálices tomentosos. Encontra-se em grandes extensões de mato, em locais secos, xistosos ou calcários no Centro e Sul de Portugal. Esta espécie tem

sido confundida com a espécie afim *Lavandula stoechas* da Região Mediterrânica (da Catalunha para o Leste), podendo-se distinguir pelas folhas menores, pedúnculos, espigas menores, mais ovóides e cálices crespo-vilosos (Amaral Franco, 1983).

O período de colheita decorre entre Maio e Junho, quando está em floração. Segundo Cunha, Silva & Roque (2006) as partes aéreas floridas são referidas em casos de ansiedade, náuseas, meteorismo e em infecções. Extractos etanólicos têm apresentado actividade antimicrobiana *in vitro*, atribuída ao óleo essencial rico em borneol. De acordo com Baldovini *et al.* (2005, citado por Zuzarte, 2007) esta espécie também apresenta elevados teores de 1,8-cineol, fenchona e cânfora. De acordo com Cunha, Ribeiro & Roque (2009) em França e no Norte de África o Rosmaninho já é utilizado em fitoterapia e destilação pela sua acção anticatarral e mucolítica. Contudo, em Portugal tem tido pouco interesse em fitoterapia e em perfumaria, devido ao óleo essencial se caracterizar por baixo teor em ésteres e elevada quantidade de borneol e de cetonas. Por vezes, é usado em culinária para aromatizar carnes e para curtimento de azeitonas de conserva. Nas festas dos santos populares é usado nas fogueiras como defumador. Para além disso, é também uma planta ornamental e aromatizante.

d) *Hypericum perforatum* L. (Hipericão Kneip ou Erva de São João)

O *Hypericum perforatum* L. é uma planta perene, da família das Gutíferáceas (Hipericáceas), apresenta 0,30 a 0,80 m de altura, erecta, glabra, rizoma-rosa. As hastes são lenhosas, as folhas são sésseis, opostas, inteiras, oblongo-elípticas, com numerosas pontuações glandulares translúcidas. Da base da inserção de cada folha saem dois filetes muito delgados, geralmente purpúreos. Circundam a haste, flores amarelas hermafroditas, dispostas em cimas dicotómicas. O fruto é uma cápsula ovóide (Cunha *et al.*, 2011).

O *Hypericum perforatum* L., também conhecido como hipericão kneip, erva-de-são-joão, hipérico, milfurada e pericão, está presente nos campos, sebes, prados e margens dos caminhos no Continente e Madeira, é também conhecida em toda a Europa. Segundo Costa (2002), é uma Hipericácea herbácea vivaz que se encontra disseminada pelo Norte de África, Ásia e Europa, excepto Islândia. Cresce “em terrenos incultos, bosques pouco densos, prados secos, geralmente solo calcário.” (Cunha & Roque, 2008, p.359). É uma planta aromática de sabor amargo, cujo cheiro intenso aumenta com a sua trituração. São utilizadas as suas sumidades floridas após secagem (inteiras ou fragmentadas), colhidas durante a floração (Cunha *et al.*, 2007).

Os seus principais constituintes são naftodiantronas, como a hipericina e a pseudo-hipericina, em quantidades que variam entre 0,05% e 0,3%; derivados da floroglucina, como a hiperforina (2,0% a 4,5%); derivados de flavonóides, como o hiperósido; derivados de xantonas; procianidinas, como vários polímeros de catequina e epicatequina; e óleo essencial (0,06 a 0,35%), constituído por monoterpenos e sesquiterpenos. Contém ainda glucose, frutose e pectina, carotenos e vitamina C (Cunha *et al.*, 2007).

O Hipericão é usado tradicionalmente como anti-inflamatório e antimicrobiano, no tratamento de feridas abertas e queimaduras de primeiro grau, sendo que, apenas mais recentemente, conforme referido por Blumenthal e col. (1998, como citado por Cunha, *et al.*, 2007) a “Comissão E Alemã” indicou o seu uso para “transtornos psicoactivos, mau humor de carácter depressivo, ansiedade e/ou agitação nervosa.” (Cunha, 2007, p. 105).

De acordo com Cunha *et al.* (2007), quando doentes depressivos (depressão leve a moderada) toleram mal os medicamentos antidepressivos clássicos, o uso de *Hypericum perforatum* é bastante adequado, sendo mesmo considerado um “medicamento de primeira linha”. É também conveniente no tratamento de sintomas psíquicos em mulheres que se encontrem na menopausa. De acordo com um estudo de Frazer e col. (2005, como citado

em Cunha & Roque, 2008), verificou-se que o hipericão reduzia significativamente os sintomas depressivos no tratamento em idosos. Actualmente já é comercializado em Portugal (a par de vários suplementos alimentares) um medicamento – Alacre – que contém um extracto obtido a partir do hipericão (INFARMED, 2008).

e) *Hypericum androsaemum* L. (Hipericão-do-Gerês)

O *Hypericum androsaemum* L., também da família das Hipericáceas, conhecida como hipericão-do-gerês, erva-mijadeira e androsemo, entre outros nomes vulgares, desenvolve-se em locais húmidos e sombrios, em especial na margem de cursos de água, em Portugal, no Minho, Beiras e Estremadura. Encontra-se também distribuída por várias regiões da Europa Ocidental e Meridional, e regiões do Próximo Oriente até ao Irão (Cunha, Ribeiro & Roque, 2009).

O *Hypericum androsaemum* L. é uma planta perene, semelhante a um arbusto, que pode atingir 1,2 metros altura e não tem qualquer revestimento por pêlos. Possui caules jovens com duas linhas longitudinais. As suas folhas são largamente ovadas a ovado-oblongas, sésseis (sem pecíolo), por vezes amplexicaules, sem cheiro a cumarina. As sépalas são oblongo-ovadas e as pétalas amarelas, obovadas. Os estiletes são recurvados e caducos. O fruto é uma cápsula globosa, sempre carnuda, vermelha tornando-se negra ao amadurecer. A sua floração ocorre entre Junho e Setembro (Antunes & Sevinete, s.d.).

O fármaco é constituído pelos ramos floridos secos, colhidos imediatamente antes ou durante o período da floração (Costa 1994; Farinha *et al.*, 1998 citado por Valentão, 2002).

Na sua constituição, possui “cera, clorofila, resina com ácido pirogálico e pirocatecolamina, ácido gálico, tanino, flobafenos, glucose e menometilamina” (Costa, 2002), não tendo sido detectada a hipericina que está presente no *Hypericum perforatum* (Cunha, Silva & Roque, 2006).

De acordo com Cunha, Silva & Roque (2006), tradicionalmente a infusão desta planta é usada como diurético, sendo também indicada para doenças hepáticas e cólicas renais, não se conhecendo contra-indicações ou efeitos secundários e toxicidade.

2. Investigação Laboratorial

2.1. Principais Constituintes de *Crataegus monogyna* L.

2.1.1. Material e Métodos

O material vegetal, *Crataegus monogyna* L. foi colhido no campo, na primeira semana de Maio de 2011, na localidade de Vale da Trave, inserida no Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros.

Usou-se o seguinte material vegetal e reagentes:

- Amostra de *Crataegi fructus*;
- Amostra de *Crataegi folium sim flore*;
- Metanol;
- Rutina;
- Ácido clorogénico;
- Ácido cafeico;
- Ácido fórmico;
- Ácido acético glacial;
- Etilmetilcetona;
- Água;
- Solução metanólica de difenilborado de aminoetanol (1%);
- Solução metanólica de polietilenoglicol 400 (5%).

Foi utilizado o seguinte material laboratorial:

- 2 Moinhos de lâminas;

- 2 Tamises com tampa;
- 2 Frascos com tampa;
- Gobelé de vidro;
- Pipetas graduadas e volumétricas;
- 2 Funis;
- Papel de filtro;
- Varetas de vidro;
- Dois balões de erlenmeyer de 50 ml;
- Banho-maria;
- Placa de gel de sílica;
- 1 pompete;
- Balança digital de sensibilidade de 0,1 g calibrada;
- Tina de vidro;
- Estufa;
- Exsicador;
- Microseringa;
- Tina dupla com cobertura;
- Dispositivo de detecção de fluorescência (UV254 e UV365).

Para esta análise recorreu-se aos seguintes métodos:

- Colheita e processamento de *Crataegus monogyna* L.;
- Extração de *Crataegi fructus* e de *Crataegi folium*;
- Cromatografia em Camada Fina (TLC) de extractos de *Crataegi fructus* e de *Crataegi folium*.

2.1.2. Procedimento Experimental

2.1.2.1. Colheita e Processamento de *Crataegus monogyna* L.

Inicialmente procedeu-se à identificação do material vegetal, que se colheu pela manhã, sendo posteriormente seco à sombra, em atmosfera seca e arejada, à temperatura de 20°C. A planta foi colocada em tabuleiros, durante 4 dias, após os quais se procedeu à operação manual de separação, designada de triagem ou monda, de modo a ficar apenas com as folhas e as bagas separadas, retirando as partes lenhosas das folhas e os pedúnculos das bagas. Por fim, procedeu-se à pesagem da amostra.

2.1.2.2. Extracção de *Crataegi fructus* e de *Crataegi folium*

Pulverizaram-se as amostras em separado (frutos e folhas) em moinho de lâminas. Tamisaram-se as amostras de modo a obter um pó muito fino (Tamis de 250 µm). O pó muito fino de bagas apresentava um tom acastanhado, enquanto o das folhas era verde. De seguida, procedeu-se à avaliação da humidade. A perda de peso foi de 27,33 por cento nas bagas e de 8,95 por cento nas folhas.

As amostras pesadas foram colocadas nos balões de erlenmeyer de 50 ml e adicionaram-se 10 ml de metanol. Aqueceu-se em banho de água a 65°C, durante 5 minutos, agitando-se frequentemente. Deixou-se arrefecer e filtrou-se por papel (filtro de pregas). O extracto metanólico de bagas (solução A) era verde-claro e o extracto metanólico de folhas (solução B) era verde-escuro.

2.1.2.3. Cromatografia em Camada Fina (TLC) de extractos de *Crataegi fructus* e de *Crataegi folium*

Como soluções problema, utilizou-se o extracto metanólico das bagas (solução A) e o extracto metanólico das folhas (solução B). A solução padrão (M) consistiu em 5 mg de rutina, 2 mg de ácido clorogénico e 2 mg de ácido cafeico em 5 ml de metanol.

Como fase estacionária usou-se a placa de gel de sílica 60F254 Merck, e como fase móvel uma solução composta por 50 ml de acetato de etilo, 7 ml de ácido fórmico, 3 ml de ácido acético glacial, 30 ml de etilmetilcetona e 10 ml de água destilada.

Procedimento Vertical: De acordo com o determinado pela Farmacopeia Portuguesa VIII (2005) revestiram-se as paredes da câmara de cromatografia com papel de filtro, para fazer a saturação da mesma, de modo a tornar o processo mais eficaz. De seguida verteu-se na câmara de cromatografia a quantidade de fase móvel suficiente para obtenção, após impregnação do papel de filtro, de uma altura de líquido adaptado às dimensões da placa. Para a saturação da câmara colocou-se a cobertura e deixou-se em repouso a 20-25°C durante 1 hora.

Foi aplicado o volume prescrito das soluções, em porções suficientemente pequenas, para obter traços ou manchas circulares colocadas a uma distância apropriada do bordo inferior e dos bordos laterais da placa. As aplicações foram feitas a uma distância de 1 cm umas das outras sobre uma linha paralela ao bordo inferior da placa.

Assim que o solvente das soluções aplicadas se evaporou, levou-se a placa para a câmara de cromatografia, colocou-se em posição vertical, ficando os pontos de aplicação sempre acima do nível da fase móvel. Fechou-se a câmara de cromatografia e manteve-se a 20-25°C. Retirou-se a placa após a fase móvel ter percorrido a distância indicada nas

especificações da monografia (15 cm). Secou-se e procedeu-se à visualização dos cromatogramas, conforme referido na bibliografia.

2.1.3. Resultados

2.1.3.1. Resultados Esperados

De acordo com Wagner, Bladt & Zgainski (1984) era espectável verificar-se zonas de fluorescência cor de laranja - Rutina e hiperósido; zonas de fluorescência azul - Ácidos fenólicos (cafeico, clorogénico); e zonas de fluorescência verde acima do hiperósido e da rutina respectivamente - derivados da apigenina, nomeadamente vitexina e vitexina-2''-O-ramnosido.

Bagas: Identificar o ácido clorogénico, o ácido cafeico, a rutina, flavonoides (hiperosido e outros com menor quantidade ou não detectáveis) como principais constituintes (Wagner, Bladt & Zgainski, 1984), não devendo a amostra ter mais de 12% de perda por secagem.

Folhas (com flor): Era espectável ter flavonóis como o hiperósido (quercetina-3-O-galactósido) e ácido clorogénico e nas flores, vitexina e vitexina-2''-O-ramnosilvitexina.

2.1.3.2. Resultados Obtidos

Comparou-se visualmente a mancha principal do cromatograma obtido com a solução problema e com a solução padrão, analisando a coloração, as dimensões e o factor de retenção (Rf) das duas manchas.

O factor de retenção (Rf) é definido como sendo a relação da distância entre o ponto de aplicação e o centro da mancha, por um lado, e a distância percorrida pela frente do solvente após o ponto de aplicação, por outro (Farmacopeia Portuguesa VIII, 2005).

Identificando as manchas obtidas por cromatografia em camada fina, podemos aferir como principais constituintes da baga os ácidos fenólicos (cafeico e clorogénico).

Na folha ocorrem flavonóides, a vitexina aparece em maior quantidade, acima da rutina, assim como o hiperósido e derivados.

2.1.3.3. Discussão dos Resultados

Ao comparar a humidade das amostras com os valores de referência é possível averiguar que a baga apresenta um valor de humidade de 27,33 %, quando não deveria ultrapassar o valor de 12 % (de acordo com os dados apresentados pela Farmacopeia Portuguesa VIII, 2005). Tal valor de humidade pode dever-se ao facto de as bagas não estarem maduras e terem sido secas inteiras e à sombra. Já o valor de 8,95 % de humidade das folhas está de acordo com os valores de referência indicados pela Farmacopeia Portuguesa VIII (2005), inferiores a 10 %.

Tal como Costa (2000) refere, importa conhecer a quantidade de água que cada fármaco apresenta pois este é um indicador do modo como foi efectuada a secagem da planta ou de uma parte dela. Neste sentido, o valor da humidade é essencial para garantir a sua conservação. Neste caso, as bagas de *Crataegus monogyna* L. apresentaram uma quantidade de humidade muito superior aos valores de referência indicados pela Farmacopeia Portuguesa VIII (2005), o que indica de que a colheita não decorreu no momento ideal (as bagas ainda não estavam maduras) e não se encontravam bem secas. Tal pode ter promovido alterações nos seus constituintes activos. Para além disso, o conhecimento da sua composição química, além de permitir a sua identificação, permite verificar o estado de pureza do fármaco vegetal, e, consequentemente, a natureza de certas fraudes.

Comparativamente com a baga, a folha possui maior quantidade de hiperósido e seus derivados, assim como vitexina. A ausência de rutina na baga deve-se ao facto da baga estar verde e não estar suficientemente madura para ser colhida. Segundo a Farmacopeia

Portuguesa VIII (2005), devia existir nas folhas e flores, um teor mínimo de 1,5 % de flavonóides expressos em hiperósido (Cunha *et. al*, 2007).

2.2. Extracção de óleos essenciais por hidrodestilação

2.2.1. Material e Métodos

Utilizaram-se folhas e flores secas de *Thymus zygis* L. e *Lavandula luisieri* L.. Este material vegetal foi colhido na segunda semana de Maio de 2011, no campo Vale das Pias, na localidade de Vale da Trave (em pleno Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros). Foi utilizado o seguinte material vegetal e reagentes:

- Amostra de *Lavandula luisieri* L.;
- Amostra de *Thymus zygis* L.;
- Reguladores de ebulição;
- Água destilada.

O seguinte material laboratorial foi utilizado:

- Dois aparelhos tipo *Clevenger*;
- Duas mantas de aquecimento;
- Balança digital;
- Provetas;
- Dois balões volumétricos de 2000 ml;
- Varetas;
- Uma pinça;
- Um copo graduado;
- Dois frascos de vidro.

2.2.2. Procedimento Experimental

- Extracção de óleos essenciais das folhas e flores secas de *Thymus zygis* L. e de *Lavandula luisieri* L. por hidrodestilação em aparelho tipo *Clevenger*.
- Cromatografia em Camada Fina (TLC) de óleo essencial de *Thymus zygis* L.

2.2.2.1. Colheita e Processamento de *Thymus zygis* L. e de *Lavandula luisieri* L.

Procedeu-se à identificação, triagem, caracterização e pesagem das amostras. Iniciou-se o processo com a operação mecânica de separação, designada triagem ou monda, de modo a ficar apenas com as partes menos lenhosas (extremidades com caule, folhas e flores). Pesaram-se 100 gramas de *Lavandula luisieri* e 300 gramas de *Thymus zygis*, colocando cada uma das amostras em balões volumétrico de 2000 ml.

2.2.2.2. Extracção de óleos essenciais das folhas e flores secas de *Thymus zygis* L. e de *Lavandula luisieri* L. por hidrodestilação em aparelho *Clevenger*

Colocou-se cada uma das amostras num balão de destilação com água destilada na proporção de 1:10 (v/v). Adicionou-se ao material vegetal, reguladores de ebulição tendo o processo decorrido ao longo de 3 horas. Dispôs-se cada um dos balões numa manta de aquecimento e montaram-se os aparelhos tipo *Clevenger* de acordo com o que está descrito na Farmacopeia Portuguesa VIII (2005).

Na hidrodestilação o material vegetal está em contacto directo com a água a ferver (temperatura não superior a 100°C). Os óleos essenciais são muito voláteis, pelo que, quando o processo de evaporação se inicia, estes são arrastados, voltando à fase líquida quando a temperatura baixa (devido à circulação de água à temperatura ambiente). Por

serem menos densos que a água ficam à superfície desta, sendo muito fácil a sua separação.

Os óleos extraídos foram separados por decantação no próprio aparelho, guardados em frascos de vidro escuro, rotulados e conservados (0 - 4°C) até análise cromatográfica. O rendimento em óleo foi obtido através da equação:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Volume de óleo obtido (ml)} \times 100}{\text{Massa do material vegetal (g)}}$$

2.2.2.3. Resultados Obtidos

Obtiveram-se os seguintes rendimentos de óleos essenciais:

Óleo essencial de *Lavandula luisieri* L.: 0,3 mm – Rendimento: 0,29 %;

Óleo essencial de *Thymus zygis* L.: 2,9 mm – Rendimento: 0,87 %.

2.2.2.4. Discussão dos Resultados

Verificou-se que a *Lavandula luisieri* L produziu menos óleo essencial em comparação com o *Thymus zygis* L., provavelmente devido ao facto de a amostra ter sido constituída por flores, folhas e caules. No entanto, o rendimento está de acordo com as monografias da Farmacopeia Portuguesa VIII (2005).

2.2.3. Principais Constituintes de *Thymus zygis* L.

2.2.3.1. Material e Métodos

Usou-se o seguinte material vegetal e reagentes:

- Óleo essencial de *Thymus zygis* L.;
- Óleo essencial em tolueno;

- Borneol;
- Acetato de bornilo;
- Timol;
- Acetato de etilo;
- Solução de ácido sulfúrico em etanol (5 %);
- Solução de vanilina em etanol (1 %).

Foi utilizado o seguinte material laboratorial:

- Placa de gel de Sílica;
- Microseringa;
- 1 copo;
- 1 pompete;
- 1 pipeta de 10 ml;
- Tina de vidro;
- Dispositivo de detecção de fluorescência (UV254)

2.2.3.2. Cromatografia em camada fina (TLC) de óleo essencial de Tomilho

Preparou-se a solução problema, fazendo uma diluição de 1:10 de óleo essencial em tolueno, e as soluções padrão que consistiram em:

B+AB – 10 mg de borneol e 5µl de acetato de bornilo em 5ml tolueno;

T – 5 mg de timol em 5 ml de tolueno;

C - 5µl de p-cimeno em 50µl de tolueno;

Como fase estacionária utilizou-se Placa de gel de sílica 60F254 Merck; e como fase móvel, tolueno, acetato de etilo (93:7 V/V) (PA Merck).

Procedeu-se às aplicações de cada solução em banda na placa de gel de sílica, em câmara de vidro saturada. Após 1 hora e 30 minutos, ocorreu um desenvolvimento de 15 cm, tendo-se feito a sua secagem à corrente de ar.

A Detecção A foi feita à luz do dia e a UV254; enquanto a Detecção B foi efectuada pulverizando com solução I (solução de ácido sulfúrico a 5 % em etanol) e solução II (solução a 1 % de vanilina em etanol) e aqueceu-se a 100-105°C durante 5-10 min, sob observação. Examinou-se imediatamente à luz do dia, tendo sido possível identificar alguns compostos.

2.2.3.3. Resultados Esperados

De acordo com Wagner, Bladt & Zgainski (1984) era esperado verificar-se os seguintes resultados:

- Borneol Rf ~0.24 - zonas de fluorescência azul;
- Acetato de bornilo Rf ~0.55 - zonas de fluorescência azul;
- Timol Rf ~0.50 - zonas de fluorescência vermelho violáceo.

2.2.3.4. Resultados Obtidos

O óleo essencial das partes aéreas floridas recentes de tomilho (*Thymus zygis* L.), obtido por arrastamento pelo vapor de água, apresenta um aspecto límpido, cor amarela clara, cheiro característico, aromático e picante.

Ao comparar visualmente a coloração das manchas do cromatograma obtido na solução problema com as da solução padrão, além das suas dimensões e dos factores de retenção (Rf), verificou-se que as restantes manchas abaixo da mancha de timol correspondem a carvacrol, linalol e α -terpineol.

O óleo de Tomilho apresenta compostos fenólicos (timol e carvacrol) de acordo com o referido na Farmacopeia Portuguesa VIII (2005). Neste âmbito, é possível averiguar que o Tomilho é, sem dúvida, uma espécie muito aromática e com elevado potencial no que se refere à obtenção de óleos essenciais.

2.3. Identificação de duas espécies de Hipericão

Neste trabalho procurou-se detectar falsificações entre duas espécies de Hipericão: *Hypericum perforatum* L. e *Hypericum androseum* L., comercializadas regularmente no mercado português. As preparações mais correntes destes fitoterápicos são drogas *in natura*, moídas ou rasuradas que não permitem a sua identificação. No entanto, é possível executar métodos experimentais muito simples que permitem detectar adulterações.

2.3.1. Material e Métodos

Usou-se o seguinte material vegetal e reagentes:

- Amostra de Hipericão Kneip (*Hypericum perforatum*) - Sumidades floridas secas, fragmentadas, colhidas durante a floração;
- Amostra de Hipericão-do-Gerês (*Hypericum androsaemum*) - Caule e folhas secas, fragmentadas colhidas após a floração;
- Hidrato de cloral.

Foi utilizado o seguinte material laboratorial:

- Moinho de lâminas;
- Tamis com tampa;
- Frasco de vidro;
- Microscópio;
- Lâminas de vidro.

2.3.2. Procedimento Experimental

Pulverizaram-se as amostras nº 1 (*Hypericum perforatum* L.) e nº 2 (*Hypericum androsaemum* L.) em moinho de lâminas durante 6 minutos. Tamisaram-se as amostras separadamente de modo a obter um pó muito fino (Tamis de 250 mm). Examinaram-se ao microscópio utilizando solução de hidrato de cloral R.

2.3.3. Resultados

2.3.3.1. Identificação

Ao examinar a amostra nº 1 (*Hypericum perforatum* L.) confirmou-se a presença de **glândulas negras** e, sobre toda a superfície, numerosas bolsas secretoras pequenas, translúcidas, visíveis à transparência. Visualizaram-se também células pigmentadas de vermelho e numerosos grãos de pólen, isolados ou em grupos densos.

Ao examinar-se a amostra nº 2 (*Hypericum androsaemum* L.) constatou-se a ausência destas glândulas negras, indicando a inexistência de hipericina e, conseqüentemente, conseguindo-se distinguir a espécie de hipericão, mesmo no estado pulverizado.

2.3.3.2. Discussão dos Resultados

Identificar e distinguir estas duas espécies de Hipericão revela-se essencial. Apenas uma das espécies - *Hypericum perforatum* L. - apresenta hipericina, sendo que apenas esta se encontra indicada para casos de depressão. Por sua vez, o Hipericão-do-Gerês (*Hypericum androsaemum* L.) apresenta propriedades hepatobiliares, sendo usado em doenças de fígado, cólicas nefríticas e cistites.

2.4. Processos rápidos de detecção de falsificações

A falsificação de óleos essenciais é uma realidade relativamente comum. Pode ter variados intuitos ou origens, como seja a intenção de obter uma maior rentabilidade dos mesmos ou apenas devido à adulteração dos seus processos de obtenção. Neste sentido, revela-se fundamental pesquisar algumas falsificações usuais nas essências, recorrendo, para tal, a métodos práticos e simples, antes de determinar os índices analíticos físicos e químicos, evitando, assim, a prática de outros ensaios analíticos mais morosos e dispendiosos. O objectivo principal deste trabalho experimental simples é permitir a detecção de falsificações (adulterações) em essências.

2.4.1. Material e Métodos

2.4.1.1. Material

Foram utilizados os seguintes reagentes:

- Timol;
- Essência de *Mentha pulegium*;
- Óleo vegetal.

2.4.1.2. Procedimento Experimental

2.4.1.2.1. Pesquisa de óleos, gorduras e resinas através de ensaio da mancha no papel

Adulterou-se a essência de *Mentha pulegium* com óleo vegetal. Numa folha de papel deitou-se uma gota de timol e uma gota de essência de *Mentha pulegium* adulterada com o óleo. Promoveu-se a sua evaporação através da colocação do papel numa estufa aquecida a 100°C, durante 20 a 30 minutos, permitindo a realização deste ensaio mais rapidamente.

Como alternativa, poderia ter-se exposto o papel ao ar durante 24 horas, sendo uma forma mais lenta de realização deste processo.

2.4.1.2.2. Pesquisa de falsificações pelo álcool, por contracção do volume de essência

Agitou-se, num tubo graduado em décimos de mililitro, 5 ml de essência e igual volume de água saturada de cloreto de sódio ou de água glicerinada a 50 %. Após um período de repouso conveniente, os dois líquidos imiscíveis devem conservar os mesmos volumes.

2.4.1.2.3. Ensaio de fucsina

Num tubo de ensaio seco, de 16 x 160 mm, colocaram-se cerca de 2 ml de essência, vedando-se o tubo de ensaio com um rolho de algodão que possuía um pequeno fragmento de fucsina. Este foi aquecido, em banho-maria fervente, de forma que a zona de condensação do líquido volatilizado atingisse o algodão. O álcool etílico, no ponto de ebulição inferior ao da água a ferver, volatilizou-se e condensou-se na ponta fria do tubo (no rolho que continha a fucsina) e dissolvendo-a, enrubescou o algodão de vermelho.

2.4.2. Resultados

Na pesquisa de óleos, gorduras e resinas, o timol evaporou-se por completo sem deixar mancha translúcida permanente. Contudo, a essência adulterada de *Mentha pulegium* manchou o papel. As essências falsificadas com óleos e gorduras, tal como, as essências velhas e resinificadas, mancham o papel.

Por sua vez, na pesquisa de falsificações por álcool, observou-se uma contracção do volume da essência a que foi adicionado álcool, confirmando-se que a essência estava falsificada.

Já no ensaio de fucsina, a partir da coloração vermelha do algodão que se observou (resultado da volatilização do álcool), comprovou-se que a essência estava falsificada com o álcool.

Capítulo VII – Conclusão

O crescente interesse pelas plantas aromáticas e medicinais, que, por sua vez, está a originar um crescimento da actividade de comércio nesta área, reforça a importância da implementação de técnicas de controlo de fraudes no comércio das mesmas.

Perante a difícil conjuntura económica actual, é essencial encontrarem-se técnicas de controlo de fraudes, que sejam economicamente viáveis e exequíveis em empresas que comercializam este tipo de produtos.

Assim, no âmbito deste mestrado, foram aplicadas várias metodologias com o objectivo de avaliar a qualidade de determinadas plantas aromáticas, medicinais e óleos essenciais com muito valor na área dos produtos de saúde à base de plantas.

As metodologias experimentais utilizadas neste trabalho são simples e mostraram ser eficientes, permitindo o seu estabelecimento em qualquer organização empreendedora e moderna que vise implementar um sistema que possa garantir a qualidade dos seus produtos.

Foram aplicadas várias metodologias (cromatografia em camada fina, hidrodestilação, metodologias de detecção de falsificações em óleos essenciais e análise microscópica de fármacos pulverizados) a várias plantas, nomeadamente, *Crataegus monogyna* (Pilriteiro), *Thymus zygis* (Tomilho), *Lavandula luisieri* (Rosmaninho), *Hypericum perforatum* (Hipericão kneip), *Hypericum androsaemum* (Hipericão-do-Gerês), que são plantas muito importantes pela sua actividade farmacológica e pelo seu valor económico. Demonstrou-se, com este trabalho, que é de extrema importância conseguir identificar sempre os componentes responsáveis pela actividade farmacológica das plantas, assim como garantir que o material vegetal apresente os valores de referência indicados na Farmacopeia Portuguesa VIII (2005). A cromatografia de camada fina (TLC) é um método fiável e simples que permite identificar compostos químicos em extractos vegetais.

No método experimental levado a cabo neste trabalho, verificou-se que as bagas de *Crataegus monogyna* L. ainda não estavam maduras e que a colheita não ocorreu no momento ideal. Constatou-se também que as mesmas não estavam bem secas, por apresentarem o valor de humidade muito superior aos valores de referência indicados pela Farmacopeia Portuguesa VIII (2005), afectando a sua conservação e composição química.

A extracção de óleos essenciais também se revelou fulcral para aferir a qualidade das plantas aromáticas, já que o valor destas plantas se deve aos seus óleos essenciais. Verificou-se que a extracção de óleos essenciais de folhas e flores de *Thymus zygis* (Tomilho), e *Lavandula luisieri* (Rosmaninho) por hidrodestilação é um processo que permite avaliar o rendimento e aroma dos óleos essenciais destas plantas. Apesar do rendimento de óleo essencial de *Lavandula luisieri* (Rosmaninho) ser inferior ao do *Thymus zygis* (Tomilho), está de acordo com a monografia da Farmacopeia Portuguesa VIII (2005). A cromatografia em camada fina também permitiu atestar o potencial do *Thymus zygis* (Tomilho), pela avaliação dos seus compostos principais, sobretudo pela presença de timol, que lhe confere propriedades farmacológicas muito importantes.

A identificação de fármacos por exame microscópico do pó é outra das técnicas relevantes para detectar falsificações. Existem em Portugal duas espécies de Hipericão que são comercializadas regularmente no nosso mercado e verificou-se que nalguns casos pode existir confusão com a identificação destas duas espécies – *Hypericum perforatum* e *Hypericum androsaemum*. Neste trabalho mostrámos que é possível distinguir estas duas espécies mesmo quando se encontram comercializadas no estado fragmentado ou pulverizado, recorrendo apenas à microscopia óptica.

A comercialização de produtos falsificados, adulterados e sem qualidade podem pôr em risco a saúde pública, pelo que este tipo de metodologias podem ser muito úteis para a detecção de certas fraudes.

Em suma, este trabalho é um ponto de partida e não um fim em si. No futuro, seria pertinente a realização de mais estudos neste âmbito, com o objectivo de pesquisar os limites de resíduos de pesticidas e critérios microbiológicos e de pureza. Seria igualmente interessante um estudo sobre esterilização de plantas medicinais, dando a conhecer os métodos utilizados e permitidos na União Europeia. É igualmente relevante conhecer a viabilidade económica desse projecto no nosso mercado.

Referências bibliográficas

Antunes, T.; Sevinat, I. (s.d.) Hipericão do Gerês – *Hypericum androsaemum* L. Disponível em: <http://www.cienciaviva.pt/projectos/pulsar/sem6.asp>. Consulta efectuada em 3 de Agosto de 2011.

Bown, D. (1995) – *Encyclopedia of herbs & their uses*. London: Dorling Kindersley Limited. 424pp.

Brandão, M. G. L.; Souza, J. P.; Graef, C. F.; Graef, V.; Santos, A. C.; Salimena, M. F.; Monte-Mór, R. L. M. (2010) Biodiversidade, Uso Tradicional De Plantas Medicinais E Produção De Fitoterápicos Em Minas Gerais. In: *Anais do XIV Seminário sobre a Economia Mineira*. Disponível em: http://www.cedeplar.ufmg.br/seminarios/seminario_diamantina/2010/D10A022.pdf. Consulta efectuada em 22 de Junho de 2011.

Calixto, J. B. (2000) Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 33: 179-189. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjmbr/v33n2/3704c.pdf>. Consulta efectuada em 19 de Julho de 2011.

Chen, S.; Yao, H.; Han, J.; Liu, C.; Song, J.; Shi, L.; Zhu, Y.; Ma, X.; Gao, T.; Pang, X.; Luo, K.; Li, Y.; Li, X.; Jia, X.; Lin, Y.; Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*. 5 (1): 1-8. DOI:10.1371/journal.pone.0008613. Consulta efectuada em 13 de Janeiro de 2012.

Costa, A. F. (2001) – *Farmacognosia – volume III* (3ª Edição). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 992pp.

Costa, A. F. (2002) – *Farmacognosia – volume II* (5ª Edição). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1120pp.

Cunha, A. P.; Silva, A. P.; Roque, O. R. (2006) – *Plantas e produtos vegetais em fitoterapia* (2ª Edição). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 702pp.

Cunha, A. P.; Teixeira, F.; Silva, A. P.; Roque, O. R. (2007) – *Plantas na terapêutica – farmacologia e ensaios clínicos*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 476pp.

Cunha, A. P.; Roque, O. R. (2008) – *Plantas medicinais da farmacopeia portuguesa*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 700pp.

Cunha, A. P.; Silva, A. P.; Roque, O. R.; Cunha, E. (2008) – *Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia* (2ª Edição). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 310pp.

Cunha, A. P.; Ribeiro, J. A.; Roque, O. R. (2009) – *Plantas aromáticas em Portugal – caracterização e utilizações* (2ª Edição). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 328pp.

Cunha, A. P. (2010) – *Farmacognosia e fitoquímica* (3ª Edição). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 668pp.

Cunha, A. P.; Roque, O. R.; Gaspar, N. (2011) – *Cultura e utilização das plantas medicinais e aromáticas*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 472pp.

Dall'Agnol, L. (s.d.) Qualificação de fornecedores de plantas medicinais na indústria de fitoterápicos. Disponível em: <http://www.nteditorial.com.br/wp/?p=1496>. Consulta efectuada em 3 de Agosto de 2011.

Denne, W. (2009) *Ervas aromáticas*. Porto: Dorling Kindersley – Civilização Editores. 143pp.

Farias, M. R.; Schenkel, E. P.; Bergold, A. M.; Petrovick, P. R. (1985) O problema da qualidade dos fitoterápicos. *Caderno de Farmácia*. **1** (2). 73-82. Disponível em:

http://www.ufrgs.br/farmacia/cadfar/v1n2/pdf/CdF_v1_n2_p73_82_1985.pdf. Consulta efectuada em 23 de Junho de 2011.

Ferraro, G. (2006) Medicamentos fitoterápicos y su control de calidad en monografias farmacopeicas. *Revista de Fitoterapia*. **6 (S1)**: 61-63. Disponível em: <http://www.fitoterapia.net/revista/pdf//G-FERRARO.pdf>. Consulta efectuada em 10 de Outubro de 2011.

Franco, J. A. (1983) Botânica das labiadas portuguesas e suas potencialidades. *I^{as} Jornadas Nacionais de Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais*. Coimbra: Oficinas Gráficas da Editorial do LNETI.

Gaedcke, F.; Steinhoff, B.; Blasius, H. (2003) *Herbal medicinal products*. Estugarda: Medpharm. 200pp.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. (2007) Plantas medicinais: factores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*. **30 (2)**: 374-381. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n2/25.pdf>. Consulta efectuada em 23 de Junho de 2011.

Grünwald, J.; Jänicke, C. (2009) – *A farmácia verde*. Rio de Mouro: Evarest Editora, Lda. 416pp.

Heller, L. (2008) *Alemães lideram comércio europeu de plantas medicinais*. Editado em 7 de Fevereiro de 2008. Disponível em: <http://www.dw.de/dw/article/0,,3113321,00.html>. Consulta efectuada em 18 de Junho de 2011.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (2008) *Folheto informativo – alacre 250mg comprimidos revestidos*. Editado em 8 de Outubro de 2008. Disponível em: http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=31101&tipo_doc=fi. Consulta efectuada em 28 de Março de 2012.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (2005) *Farmacopeia portuguesa VIII*. Lisboa: INFARMED. 3175pp.

Lewis, R. (2001) *Human genetics – concepts and applications* (4ª Edição). New York: McGraw-Hill. 408pp.

Li, M.; Cao, H.; But, P. P. H.; Shaw, P. C. (2011) Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes. *Journal of Systematics and Evolution*. **49** (3): 271-283. DOI: 10.1111/j.1759-6831.2011.00132.x. Consulta efectuada em 13 de Janeiro de 2012.

Lima, I. O.; Oliveira, R. A. G.; Lima, E. O.; Farias, N. M. P.; Souza, E. L. (2006). Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **16** (2). 197-201. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v16n2/v16n2a11.pdf>. Consulta efectuada em 19 de Julho de 2011.

Martins, A. P. (2008) – O uso tradicional como evidência na regulamentação dos medicamentos à base de plantas. *Infarmed 15 anos: olhar o passado, projectar o futuro*. 101-107. Disponível em: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/INSTITUCIONAIS/15_ANOS/pdf_FINAL_infarmed.pdf. Consulta efectuada em 19 de Julho de 2011.

Mcvicar, J. (2003) – *O poder das ervas aromáticas*. Porto: Dorling Kindersley – Civilização Editores. 288pp.

Monteiro, A. R. M. (2008) - *Produtos à base de plantas dispensados em ervanárias para o emagrecimento: efeitos terapêuticos, toxicologia e legislação*. Dissertação de Mestrado em Medicina Legal – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, 127 pp.

Nascimento, V. T.; Lacerda, E. U.; Melo, J. G.; Lima, C. S. A; Amorim, E. L. C.; Albuquerque, U. P. (2005). Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais

comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. **7** (3): 56-64. Disponível em: <http://www.etnobotanicaaplicada.com.br/pt/gerenciador/uploadfiles/927b282dc7936ee4eacee13bf72f5460.pdf>. Consulta efectuada em 10 de Outubro de 2011.

Parthik, P; Patel, N. M. Patel, P. M. (2011) WHO guidelines on quality control of herbal medicines. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*. **2** (4): 1148-1154. Disponível em: http://www.ijrap.net/admin/php/uploads/563_pdf.pdf. Consulta efectuada em 7 de Outubro de 2011.

Silva, P. A.; Souza, L. b. G.; Cortez, L. E. R. (2009) Análise microbiológica de amostras secas de camomila comercializadas na cidade de maringá – pr. VI Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar. Disponível em: <http://ebookbrowse.com/gdoc.php?id=251212298&url=628adf34038bf26268daa023d2af40ae>. Consulta efectuada em 8 de Agosto de 2011.

Thomson, W. A. R. (1980) – *Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales*. Barcelona: Editorial Blume. 220pp.

Toledo, A. C. O.; Hirata, L. L.; Buffon, M. C. M.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G. (2003) Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta*. **21**(1/2): 7-13. Disponível em: http://www.saofrancisco.edu.br/edusf/publicacoes/revistalecta/volume_02/uploadaddress/lecta-2%5B6224%5D.pdf. Consulta efectuada em 26 de Setembro de 2011.

Valentão, P. C. R. (2002) – *Limonete, hipericão-do-gerês, cardo-do-coalho, fel-da-terra - metodologias de controlo de qualidade com base na fracção fenólica Estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora*. Dissertação de Doutoramento – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 313 pp.

Volák, J.; Stodola, J. (1983) – *Plantas medicinales*. Paris: Gründ. 319pp.

Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainski, E. M. (1984) *Plant drug analysis – a thin layer chromatography atlas*. Germany: Springer-Verlag. 320pp.

Waizel-Bucay, J. (2011) Plantas y compuestos importantes para la medicina: los sauces, los salicilatos y la aspirina. *Revista de Fitoterapia*. **11** (1): 61-75.

Webb, M. A.; Craze, R. (2001) – *O guia das plantas & especiarias*. Lisboa: Centralivros, Lda. 375pp.

World Health Organization (1998) Basic tests for drugs – pharmaceutical substances, medicinal plant materials and dosage forms. Geneva: World Health Organization. 89pp. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/h1793e/h1793e.pdf>. Consulta efectuada em 15 de Dezembro de 2011.

World Health Organization (2003). *WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants*. Geneva: World Health Organization. 72pp. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241546271.pdf>. Consulta efectuada em 15 de Dezembro de 2011.

World Health Organization (2009) WHO monographs on selected medicinal plants – volume 4. Geneva: World Health Organization. 444pp. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/areas/traditional/SelectMonoVol4.pdf>. Consulta efectuada em 15 de Dezembro de 2011.

Zuzarte, M. R. (2007) – *Lavandula pedunculata* (Miller) Cav.: estruturas secretoras, óleos essenciais e cultura in vitro. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Vegetal – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 121 pp.